

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 532

TITRE DE LA THÈSE

RECHERCHES
SUR LES CONSTITUANTS CHIMIQUES
DE VINCETOXICUM OFFICINALE MOENCH
(ASCLEPIADACEAE)

(Etude comparative
entre la plante et la culture de tissus in vitro)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 25 Mai 1967

par

FRANC KOZJEK

né le 7 Janvier 1938

à TRBOVLJE (Yougoslavie)

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE LYON

Année 1967 - N° 532

TITRE DE LA THÈSE

RECHERCHES
SUR LES CONSTITUANTS CHIMIQUES
DE VINCETOXICUM OFFICINALE MOENCH
(ASCLEPIADACEAE)

(Etude comparative
entre la plante et la culture de tissus in vitro)

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 25 Mai 1967

par

FRANC KOZJEK

né le 7 Janvier 1938

à TRBOVLJE (Yougoslavie)



--ooOoo--

PERSONNEL DE LA FACULTE

=====

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J.F. CIER

Assesseurs :

M. M. LEVRAT

M. J. DORCHE

Conseiller Administratif:

M. H. PRUVOST

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PATEL - LEPINE - TRILLAT - GARIN - GATE - MARTIN -
GABRIELLE - SANTY - DUCLOS - GUILLEMINET - HERMANN -
ROCHET - POLLOSSON - ENSELME - WERTHEIMER - SARROUY -
BANSSILLON - DECHAUME - LACROIX.

PROFESSEURS

MM. J. CIBERT	Clinique urologique
P. PONTIUS	Physique biologique (détaché à Beyrouth)
M. CHAMRON	Chimie organique et toxicologie
F. PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
R. FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
P. CROIZAT	Clinique médicale C
P. MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
L. REVOL	Pharmacie galénique
H. PIGEAUD	Clinique obstétricale
J. BOURRET	Médecine du Travail
M. LEVRAT	Clinique médicale A
R. SOHIER	Bactériologie - Virologie - Immunologie
G. NETIEN	Botanique et Cryptogamie
P. BERTRAND	Clinique chirurgicale C
A. BADINAND	Chimie Analytique et Pharmaceutique
B. DREVON	Pharmacie chimique et Pharmacologie
L. ROCHE	Médecine Légale et Déontologie
J. COUDERT	Parasitologie et Pathologie exotique

.../...

MM. P. MOUNIER-KUHN	Clinique d'Otho-Rhino-Laryngologie et d'audiophonologie
L. PAUFIQUE	Clinique Ophtalmologique
H. THIERS	Clinique de Dermatologie, Syphiligraphie et Allergologie
J. BRUN	Clinique de Pneumophtisiologie
J. CREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
M. DARGENT	Clinique carcinologique
M. BERGER (1)	Physique nucléaire appliquée à la Médecine
A. GUICHARD	Anatomie Pathologique
P. GIRARD	Pathologie générale et expérimentale
M. GIRARD	Clinique médicale D
M. LATARJET	Anatomie
R. PEYCELON	Clinique chirurgicale B
A. VACHON	Pathologie médicale
P. GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
J. PAPILLON	Radiologie
M. JEUNE	Clinique médicale infantile et Hygiène du 1er Âge
A. GONIN	Thérapeutique
P. MONNET	Clinique médicale infantile B
J. CHATONNET	Physiologie B
P. GUINET	Clinique endocrinologique
H. COLLET (1)	Chimie générale et pharmaceutique
A. TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
Ch. FREIDEL	Clinique stomatologique
J. MARION	Clinique de chirurgie et d'Orthopédie infantiles
J. DORCHE	Matière médicale et Legislation pharmaceutique
L. MANSUY (1)	Neurochirurgie
L. REVOL (1)	Hématologie
J. LECUIRE (1)	Neurochirurgie
H. LIARAS (1)	Clinique chirurgicale propédeutique
L. PERROT	Chimie
J.F. CIER	Physiologie A
J. PERRIN	Thérapeutique chirurgicale et Chirurgie opératoire
P. GUINARD (1)	Clinique thérapeutique chirurgicale et chirurgie expérimentale
P. MICHAUD	Clinique de chirurgie cardiaque
M. PONT (1)	Médecine générale
J. TRAEGER (1)	Pathologie métabolique et rénale
J. MATHIEU	Clinique gynécologique
G. FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
A. BERTOYE	Clinique des Maladies Infectieuses
G. VIGNON	Hydrologie thérapeutique, climatologie et Ecologie sociale
D. VINCENT	Biochimie appliquée
A. CIER	Pharmacodynamie
L. COLOBERT	Chimie biologique et médicale
X	Pathologie chirurgicale
X	Clinique neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
X	Physiologie et pathologie obstétricale

.../...

(1) Professeur à titre personnel

X	Hygiène et Action sanitaire et sociale
X	Histologie et Embryologie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.ROMAN	Parasitologie
FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du Travail
THIVOLET	Hygiène
MALLEIN	Chimie analytique
PINET	Electro-radiologie
COLOMB	Dermatologie

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM.CREYSSEL R.	Chimie biologique
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES Fr.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
LAMBERT	Médecine générale
FRIES	Médecine générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie générale
VIALA	Médecine générale

.../...

MM. VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
GIROD	Histologie et Embryologie
GRAS	Chimie biologique
COLIN	Médecine légale
BERTRAND	Chimie biologique
MARET	Chirurgie générale
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie
CHOLLAT	Electro-radiologie
FLEURETTE	Bactériologie
FLANDRUIS	Physiologie
MOREL	Hématologie
TERMET	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
FREDERICH	Pharmacologie
DAUDET	Chirurgie infantile
BRUNE	Médecine générale et Thérapeutique
LOMBARD-PLATET	Chirurgie générale
BOUVIER	Rhumatologie
FREYCON	Pédiatrie
LAPRAS	Neuro-chirurgie
PELLET	Physiologie
DUQUESNEL	Electroradiologie
DEJOUR	Orthopédie et Traumatologie
MOULIN	Dermato-Vénérologie
PERRIN-FAYOLLE	Pneumo-phtisiologie
PALIARD	Médecine générale et Thérapeutique
MORGON	O.R.L.
PAUPERT-RAVAULT M.	Ophtalmologie
MOTIN	Anesthésiologie
PASQUIER	Médecine générale et Thérapeutique
VAUZELLE	Anatomie pathologique
CZYBA	Histologie et Embryologie
CABANAC	Physiologie
TOURAINÉ	Pneumo-phtisiologie
BEL	Médecine générale et Thérapeutique
CHARVET	Gynécologie obstétrique
X	Cancérologie
X	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
BRAILLON	Anatomie et Chirurgie générale
VILLIERS	Chirurgie générale
LOUISOT	Chimie biologique et Chimie des Explorations fonctionnelles
COURJON	Neuro-psychiatrie
MORNEX	Médecine générale

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE-GILLY	Hématologie
RIFFAT	Hygiène
ROLLET	Pharmacie galénique
BIZOLLON	Physique

.../...

AGREGES EN EXERCICE

M. BONAMOUR	Ophtalmologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
NOTTER	Gynécologie obstétricale
de MOURGUES G.	Chirurgie générale
DUMONT Martial	Obstétrique
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
DEVIC	Médecine générale
SAUBIER	Chirurgie générale
DURAND	Urologie
HUGONNIER	Ophtalmologie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
GARDE	Médecine générale
FAYSSÉ	Orthopédie
GAILLARD	O.R.L.
PERRIN A.	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
MUUNIER-KUHN A.	Chirurgie générale
CHASSARD	Electro-radiologie
GARNIER	Obstétrique
DUMAS	Stomatologie
SCHNEPP	Orthopédie
NUEL	Médecine générale

=====

Examineurs de la Thèse :

- Président : M. le Professeur G. NETIEN

- Assesseurs : M. le Professeur DORCHE
M. le Professeur LACHARME
M. le Professeur LEBRETON Ph.

---oo0oo---

A M A M E R E

En témoignage de ma profonde
reconnaissance.

Puisse ce travail lui procurer
une récompense à tous ses soins

---oo0oo---

---oo0oo---

A M O N F I L S

A M A F E M M E

A M A S O E U R

A M E S B E A U X - P A R E N T S

e t à T O U S M E S A M I S

"Si la terre est ronde c'est pour que
l'amitié puisse en faire le tour".

-Teilhard de Chardin -

---oo0oo---

---oo0oo---

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur G. NETIEN
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui m'a fait le grand honneur de diriger mes
travaux et de présider le Jury de cette thèse.

Témoignage de ma profonde gratitude et de
ma respectueuse reconnaissance.

---oo0oo---

---oo0oo---

A MONSIEUR LE PROFESSEUR

Ph. LEBRETON

Avec mes très sincères remerciements pour
m'avoir accueilli dans son laboratoire et
m'avoir permis de mener à bien la partie
chimique de ma thèse.

---oo0oo---

---oo0oo---

A MONSIEUR LE PROFESSEUR

J. DORCHE

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de faire
partie du Jury de ma thèse.

En hommage respectueux.

---oo0oo---

---ooOoo---

A MONSIEUR LE PROFESSEUR

J. LACHARME

Qui a bien voulu être membre de mon Jury.

Avec mes très sincères remerciements.

---ooOoo---

A V A N T - P R O P O S

=====

Ce travail a été fait au Laboratoire de Botanique de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de LYON, au Laboratoire de Biochimie végétale de la Faculté des Sciences de LYON et au Laboratoire d'Institut de Pharmacie de LJUBLJANA.

Je suis très heureux de pouvoir remercier Monsieur le Professeur G. NETIEN d'avoir bien voulu m'accueillir deux années de suite dans son laboratoire, de m'avoir inspiré le sujet de ma thèse et de m'avoir profondément aidé par ses connaissances scientifiques et sa compréhension humaine. Je remercie spécialement Monsieur le Professeur G. NETIEN de m'avoir mis en rapport avec le Laboratoire de Biochimie végétal de la Faculté des Sciences de LYON, où il me fut donné de pouvoir m'initier à la biochimie des composés flavoniques.

C'est plus particulièrement à Monsieur le Professeur Ph. LEBRETON que je dois cet enrichissement de mes connaissances. Grâce à sa grande expérience scientifique j'ai pu mener mon travail à son terme. Qu'il me soit permis d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Ph. LEBRETON.

Une partie de mon travail a été faite au Laboratoire d'Institut de Pharmacie de LJUBLJANA chez Madame la Directrice V. BRECELJ et Monsieur le Professeur D. KARBA. Qu'il me permettent de leur témoigner ma vive et respectueuse gratitude pour l'intérêt et les encouragements qu'ils ont toujours manifesté au cours de cette recherche.

J'assure de ma très vive gratitude Madame et Monsieur ZAJC, Docteurs en Pharmacie, qui m'ont accueilli une première fois en France, m'ont permis de rencontrer Monsieur le Professeur G. NETIEN et de réaliser ce travail.

Je remercie tout le personnel des Laboratoires de Botanique et de Biochimie végétale auprès duquel j'ai toujours trouvé un bon accueil et qui m'a aidé dans mon travail.

-----oo000oo-----

PLAN DE TRAVAIL

=====

INTRODUCTION

Première partie : ETUDE BOTANIQUE

1. Classification botanique de Vincetoxicum officinale Moench
2. Description de la famille des Asclépiadacées
3. Description du genre Vincetoxicum Pers.
 - A. Les différentes espèces de Vincetoxicum
 - B. Description de quelques espèces européennes de Vincetoxicum
4. Description de Vincetoxicum officinale Moench
 - A. Morphologie
 - B. Biogéographie et écologie

Deuxième partie : ETUDE CHIMIQUE

1. Composition générale
 - A. Techniques
 - B. Résultats
2. Les substances polyphénoliques
 - A. Techniques particulières
 - a) Chromatographie
 - b) Spectrophotométrie

B. Résultats

- a) Identification et dosage des composés flavoniques
- b) Extraction des substances polyphénoliques
- c) Etude de la substance polyphénolique majeure
- d) Etude des substances polyphénoliques mineures
- e) Hypothèses biogénétiques

3. Les substances stéroliques

A. Travaux antérieurs

B. Travaux personnels

- a) Extraction
- b) Purification
- c) Essai de détermination structurale
- d) Evolution colorimétrique

Troisième partie : LA CULTURE DE TISSUS IN VITRO

A. Travaux antérieurs

B. Travaux personnels

- a) Préparation de la culture
- b) Etude chimique

---ooo00ooo---

I N T R O D U C T I O N

=====

Vincetoxicum officinale Moench croît en Europe, dans toutes les régions montagneuses calcaires, soit en bordure des bois, soit plus fréquemment sur les terrains rocaillieux ensoleillés. Le nom populaire de Dompte-venin est la traduction du latin "Vincetoxicum" et rappelle l'emploi de cette plante, dès le XVI^{me} siècle, contre les morsures de serpents ou de chiens enragés.

Jadis, cette espèce considérée comme assez toxique, était utilisée en thérapeutique, par sa racine, comme diurétique, sudorifique et émétique. CAZIN trouve qu'une macération de 10g de racines pulvérisées dans un litre d'eau ou de vin agit sur les voies urinaires et le système cutané, d'où l'emploi contre "l'hydropisie, les engorgements hépatiques, hyphatiques et glanduleux, la jaunisse, les affections scrofuleuses, dartreuses et syphilitiques"; à dose plus forte (15g par litre) la racine est vomitive et purgative.

Cette drogue, inscrite dans l'ancienne pharmacopée, est retombée dans l'oubli; son étude pharmacodynamique a rarement été entreprise. Cependant, dès la fin du XIX^{me} siècle, TANRET avait obtenu un glycoside appelé vincétoxine, se présentant sous la forme d'une poudre jaune amorphe, très

soluble dans l'eau, l'alcool ou le chloroforme mais insoluble dans l'éther. D'après ses réactions chimiques, la vincétoxine se rapprochait de la convallamarine et de la digitaline, ce qui aurait dû inciter plus particulièrement les chercheurs à l'obtention et à l'étude de ce "cardénolide".

Il est toujours intéressant, connaissant les propriétés et les usages thérapeutiques attribués à des plantes et signalés dans les ouvrages de Matière Médicale, d'essayer de retrouver, à l'aide de techniques modernes d'analyses, le principe actif, responsable de cette activité.

C'est dans cette optique de recherche que nous avons orienté nos efforts et entrepris une étude des divers constituants de cette plante, spécialement dans le domaine de dérivés flavoniques et stéroliques.

---oo00oo---

Première Partie

E T U D E B O T A N I Q U E
=====

1) - Classification botanique de Vincetoxicum officinale Moench.

Embranchement	:	Cormophyta
Division	:	Anthophyta
Sous-division	:	Angiospermae
Classe	:	Dicotyledonae
Sous-classe	:	Metachlamydeae (Sympetalae)
Ordre	:	Contortae
Sous-ordre	:	Gentianinae
Famille	:	Asclepiadaceae
Tribu	:	Asclepiadeae
Sous-tribu	:	Cynanchinae
Genre	:	Vincetoxicum Pers.
Espèce	:	Vincetoxicum officinale Moench. ou Cynanchum vincetoxicum (L.) Pers. ou Asclepias vincetoxicum L. (1,2).

Noms vernaculaires :

En français	:	Dompte venin (3), contrepoison, Asclépiade blanche (4).
En allemand	:	Schwalbenwurz, St. Lorenzkraut, Hunds- würger, Giftwender (5).

En anglais : Swallowwort, Tame poison (6)
En italien : Vincitossico, Erba sete, Asclepiade.
En espagnol : Vincetosigo salvago.
En yougoslave: Kokosèvec (7), Divlja paprika (8).

=====

2) - Description de la famille des Asclépiadacées.

Les plantes sont des herbes ou des arbustes, souvent des lianes herbacées, ligneuses, succulentes, cactéoïdes, rarement des arbres; plus rarement épiphytes, éphédroides ou aphylls. Le rhizome est parfois tuberculeux-bulbeux (Ceropegia). Les feuilles sont presque toujours opposées, sans stipules. Les inflorescences sont habituellement cymeuses ou du type de la grappe, terminales ou axillaires. Les fleurs sont hermaphrodites et penta-mères. Le calice a les sépales plus ou moins libres, habituellement glanduleux à la base interne. La corolle est gamophylle plus ou moins tubuleuse, étalée ou campanulée, parfois très ornementale mais en préfloraison habituellement tordue. La paracorolle ou "couronne" est diversement conformée. Ses pièces sont indépendantes ou conconcentriques, dépendant, soit de l'androcée (une couronne staminale : Asclepias), soit de la corolle (Ectadium), soit de ces deux organes floraux (une couronne double, staminocorollaire), la couronne peut manquer (Pentamera Bl.) (9).

Les étamines à anthères sessiles ou au bout d'un court filet sont libres, rarement cohérentes en tubes, le plus souvent en connexion étroite avec le stigmate, et formant avec lui un ensemble appelé gynostème ou gynostège. Le pollen est en tétrades ou aggloméré en pollinis. Entre les étamines, sur la partie renflée du style, existent des

petits disques (corpuscules) qui sécrètent un liquide visqueux et sont reliés avec deux masses polliniques par l'intermédiaire de deux bras (caudicules). La paire de pollinies est ainsi constituée de deux moitiés d'anthères différentes provenant des loges de deux étamines voisines. Les insectes qui visitent les fleurs, enlèvent les corpuscules qui s'accrochent à leurs pattes, et entraînent les pollinies qui sont ainsi transportées sur d'autres fleurs.

Les Asclépiadacées à pollen granuleux en tétrades, non en pollinies, ont, à la place des corpuscules à caudicules, des organes de tissu muqueux de formes diverses, recevant le pollen déversé : ce sont les translateurs. Le gynécée supérieur est formé de deux carpelles incomplètement unis dans la partie ovarienne. Les ovules sont nombreux, anatropes et habituellement épitropes, réduits. Les styles sont soudés en haut et fortement dilatés au sommet (tête stigmatique) à cinq faces contre lesquelles sont appliquées les anthères, tandis que les cinq angles portent les cinq corpuscules et, en dessous, les cinq plages stigmatiques.

Le fruit est formé de deux follicules déhiscent par la suture ventrale.

La graine est habituellement pourvue d'une touffe de poils. Les Asclépiadacées sont remarquablement adaptés à la fécondation croisée entomophile.

C'est une famille très importante dont la plupart des espèces croissent dans les contrées chaudes de tout le globe. On en a décrit environ 1 700 espèces. Les genres les plus importants sont :

Gomphocarpus L. et Cynanchum L. avec environ 100 espèces.
Asclepias L., Ceropegia L., Oxypetalum R. Br., Stapelia L.
avec environ 80 espèces.

Hoya R. Br., Marsdenia R.Br., Gonolobus Moench. avec
environ 70 espèces.

Secamonae L. avec environ 40 espèces.

La plupart des espèces de la famille des Asclépiadacées poussent en Afrique et en Amérique du Sud (10) et c'est la raison pour laquelle elles ne sont pas très bien étudiées. Leur nomenclature est défectueuse et la classification difficile (2). Schumann (11) a entrepris la nomenclature et la classification de la famille des Asclépiadacées, Bullock(1) les a parfaits et mis en ordre. Abisch et Reichstein (2) ont déterminé dans les plantes de cette famille les alcaloïdes, les glycosides stéroliques, les saponosides et les glycosides cardiotoniques (12). Ils n'ont pas examiné toutes les espèces de la famille des Asclépiadacées mais c'est une importante contribution à la taxonomie chimique.

La famille des Asclépiadacées se divise , d'après Schumann (13) en plusieurs tribus dont la plus importante est la tribu des Asclépiadées. Elle se divise en plusieurs sous-tribus notamment les Asclépiadinées et Cynanchinées.

Le genre Vincetoxicum Pers. avec l'espèce Vincetoxicum officinale Moench. appartient à la sous-tribu Cynanchinées. Le genre Vincetoxicum rassemble environ 80 espèces dont l'étude n'est pas complète.

Les quatre genres des Asclépiadées qui poussent en Europe ont comme caractéristique commune que leurs étamines dont les filets sont soudés en tube et portent chacun à leur sommet un appendice, l'ensemble de ceux-ci constituant une sorte de couronne qui entoure les anthères. Les genres voisins Cynanchum et Vincetoxicum ont une couronne d'une seule pièce. Elle est en forme d'écuelle, terminée par cinq ou dix courtes dents dans le genre Vincetoxicum tandis que celle du genre Cynanchum est en tube, surmontée de cinq ou dix lobes longs et étroits. Le genre Asclepias se rapproche du genre Gomphocarpus par la couronne qui est formée de cinq cornets; chaque cornet renferme, dans le premier de ces genres, un appendice en forme de corne tandis qu'il en est dépourvu dans le deuxième.

3) - Description du genre Vincetoxicum Pers.

D'abord Caesalpinus et ensuite Nicholson (14) ont déterminé sous le nom Vincetoxicum un grand groupe de plantes, qui poussent en Asie tempérée, en Amérique du Sud et en Europe. Le nom Vincetoxicum vient des mots latins vincere = vaincre et toxicum = poison. Les plantes de ce genre étaient autrefois considérées à tort comme un contrepoison.

Le genre comprend plus de soixante-dix espèces de plantes herbacées, vivaces ou sous-frutescentes, dressées ou volubiles, habitant les régions chaudes et tempérées du globe. Elles poussent rarement sous les tropiques.

Les fleurs sont ordinairement blanches ou jaune-verdâtre mais aussi pourpre et parfois presque noires. Elles sont réunies en cymes axillaires de formes variables. Le calice a cinq divisions et les sépales sont lancéolés ou ovales. Ils ont une ou plusieurs glandes. La corolle est un peu arrondie, rarement campanulée et profondément quinquépartite. Les pétales peuvent être libres ou soudés. La coronule est insérée sur le tube staminal, subentière, dentée à cinq ou dix lobes courts ou profonds. Ce genre est surtout caractérisé par la couronne des étamines qui est charnue, en forme d'écuelle et groupant cinq ou dix lobes courts, arrondis au sommet.

Après la fécondation se forme un fruit en forme de gousse renflée à sa base ou en son milieu et pointue dans sa partie supérieure.

Les feuilles des plantes de ce genre sont à limbe ovale étiré en pointe, vert foncé, parfois un peu en coeur renversé, et ont un court pétiole. Elles sont opposées ou rarement quaternées, verticillées ou alternes.

Le genre *Vincetoxicum* Pers. est très répandu. En raison de leur dispersion considérable dans le monde, leurs espèces ne sont pas encore bien connues.

3) - a) Les différentes espèces de Vincetoxicum.

Le genre Vincetoxicum Rupp. Fl. Jen. ed. Hall 25 (1745) renferme d'après l'Index Kewensis (15) et ses suppléments (16-27) actuellement paru les espèces suivantes :

VINCETOXICUM :

- adenocardium, Stanley in Publ. Field. Mus. Nat. Hist. Chicago, Bot. Ser. XVII. 267 (1937) - Mexico
- alabamense, Vail in Bull. Torr. Bot. Club. 1903 - Am. bor.
- anatolicum, Boiss. Diagn. Ser I - As. Min., Persia, Afgan.
- angulatum, Kuntze I.c. 424 - Bras.
- atratum, Morr. Decne. in Bull. Acad. Brux. (1836) 17 - China, Japon
- calcaratum, R.E. Woodson in Am. Journ. Bot. (1935), XXII, 689 - Mexico
- corymbosum, Benth. Hook. f. Gen. II, 762 - Ind. or.
- crenatum, Vail. in Bull. Torr. Bot. Club. (1899), 429 - Mexico
- cuspidatum, Busby in Mem. N.Y. Bot. Gard. VII, 333, (1927) - Boliv.
- darvasicum, B. Fedtsch. Consp. Fl. Turkest. V, 15, (1913) - Turkestan
- dionysiense, Mouterde, Fl. Djebel Druze 164, (1953) - Syrie
- discolor, Warb in Bot. Jahrb. XI 11, 409, (1899) - N. Guin.
- elegans, Benth. Fl. Austral. 1V, 330 - Austral.
- floribundum, Franch. Sav. Enum. Pl. Jap. II, 444 - Japon
- floridanum, Vail I.C. - Am. bor.
- fuscatum, Reichb. Ic. Fl. Germ. XVII, 17 - Europe or., As. min.
- grandiflorum, Stanley I.c. 83 - Guatem
- heterophyllum, Vatke in Linnaea XI, 212, (1876) - Afr. trop.
- Huteri, Vir. Aschers. in Oestr. Bot. Zeitschr. XIX, (1869), 67 - Europe
- intermedium, Taliew in Trav. Soc. Nat. Kharkow XXXIV, 251 - Europe

- japonicum, C.Morr.Decne.in Bull.Acad.BruX.17,(1836) - Japon
- jailicola, Juzepczuk in Nat.Syst.Herb.Inst.Bot.Acad.Sc.XIV,
18,(1951) - Crimea.
- latifolium, Stev.in Bull. Soc. Nat. Mosc.XXX, I,(1857)-Tantia
- leptolepis, Benth.Fl.Austral. IV, 331 - Austral.
- linifolium, Balf. f. in Proc.Roy.Soc.Edinb.XII, 79,(1884)Ins. Socotra
- luteum, Hoffmq.Link.Fl.Port.I,381 - Lusitan
- madagascariense, K.Schum.in Bot.Jahrb.XVII,138,(1893)-Madagas.
- mandschuricum, Hance in Ann.Sc.Nat.Ser.V, 27,(1866) - Persia
- melanthum, Decne.in DC.Prod.VIII, 526 - Bras.
- mexicanum, S.Wats. in Proc.Am.Acad.XVIII, 115 (1883)-Mexico
- Meyeri, Benth.Hook.f.Gen.II,762 -Af.austral.
- mongolicum, Maxim. in Bull.Acad. Peters.XXIII,356(1877)-Mongol.
- nigrum, Moench.Meth.Suppl.313 - Europe austr.,As.Min.
- nivele, Boiss.Heldr.Diagn.Ser.I, 20 - Graecia
- obtusifolium, Kuntze, Rev.Gen.III, 200 - Afr.austr.
- officinale, Moench.Meth. 717 - Europe, Reg.Cauc.
- ovatum, Benth.Fl.Austral.IV, 330 - Austral.
- palustre, A.Gray.Syn.Fl.N.Am.II, 102 - Am.bor.
- parviflorum, Decne.in DC.Prod.VIII, 525 -As.Min.
- pumilum, Decne.in DC.Prod.VIII, 525 - Persia
- purpurascens, C. Morr.Decne.in Bull.Acad.BruX. 17,(1836)-Japon
- pilosum, Nichols.Dict.Gard.IV, 160,(1887)-Afr.austr.
- polyanthum, K.Schum.in Bot.Jahrb.XVII,136(1893)-Afr.trop.
- pueblense, T.S.Breandegge in Univ.Calif.Publ.Bot.IV,91,(1910)-
Mexico
- Rehmanni, Boiss.Fl.Orient.IV, 53 - Reg.Cauc.
- roseum, Benth.Hook.f.Gen.II,762 - Dahuria
- Raddeanum, Alboff.Prodr.Fl.Colch.170,(1895) - Reg.Cauc.

- Roberti, S. Moore in J. Bot. 104, (1904) - Bras.
- rubelum, Franch. Sav. Enum. Pl. Jap. II, 442 - Japon
- Rutenbergianum, Vatke in Bremen. Abh. IX (1885), 126 - Afr. trop.
- scandens, Somm. Levier in Act. Hort. Petrop. XII (1892), 158 - Reg. Cauc.
- sibiricum, Decne. l.c. 525 - Sibir., China
- speciosum, Boiss. Heldr. Diagn. Ser. I, 39 - Graecia
- stauropolitanum, Pobedim. l.c. 284 - Caucas.
- tauricum, Pobedim l.c. 282 - Crimea
- umbellatum, Rusby in Mem. Torr. Bot. Club. VI, 78 - Bolivia
- versicolor, Decne in D.C. Prod. VIII, 524 - China
- virescens, K. Schum. in Bot. Jahrb. XVII, 137 (1893) - Madag.
- volubile, Maxim. Prim. Fl. Amur. 195 - Mandchuria.

On trouve en Europe seize espèces dont une est cultivée :

VINCETOXICUM :

- adriaticum R. Beck.
- fuscatum Reichb.
- glomeratum Beckhaus
- intermedium Taliew
- medium Decne.
- nigrum Moench.
- nivale Boiss.
- officinale Moench.
- platylobum Geisenheyner
- Raddeanum Alboff.
- Rehmanni Boiss.

- scandens Somm. Levier.
- speciosum Boiss.
- stenolobum Geisenheyner
- tomentosum Beckhaus

3) - b. Description de quelques espèces européennes de Vincetoxicum.

- Vincetoxicum fuscatum Reichb.

Les fleurs sont jaunes et réunies en cymes axillaires. Les pétales sont ovales et la corolle est barbue. Les tiges ont de 60 à 100 cm de hauteur et sont volubiles au sommet. Vincetoxicum fuscatum pousse dans le sud-est de l'Europe. Synonyme : Cynanchum minus C.Koch.

- Vincetoxicum medium Decne.

Les fleurs sont blanches avec la corolle non barbue. Les pédicelles sont à peine plus longs que les pédoncules. Les fleurs sont en forme d'ombelles souvent ramifiées. Les feuilles sont largement ovales, obtuses ou ovales-lancéolées et pointues. La plante fleurit en mai. Les tiges ont de 60 à 100 cm de hauteur et sont volubiles au sommet. Vincetoxicum medium pousse en Europe orientale (Caucase).

- Vincetoxicum nigrum Moench.

C'est une plante dont les tiges, de 40 à 100 cm de

longueur, sont tantôt dressées, tantôt plus ou moins grim-pantes et volubiles. On la rencontre sur les coteaux, dans les bois et les endroits incultes et pierreux d'une partie assez étendue de la région méditerranéenne. Les fleurs colorées en brun-rouge ou rouge-noirâtre apparaissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'août. Les feuilles ont un très court pétiole et le limbe est ovale, très étiré en pointe dans le haut de la tige, plus arrondi dans le bas.

Les fleurs sont placées chacune sur un pédoncule trois à quatre fois plus long qu'elle. Elles sont groupées en petit nombre formant des sortes d'ombelles simples à l'aisselle des feuilles. La corolle a cinq lobes étalés, couverts de petits poils. La couronne des étamines a cinq lobes épais alternant avec cinq lobes bien plus courts. Les fruits mûrs ont, en général, de 6 à 8 cm de longueur. La plante pousse en Europe méridionale et en Russie centrale.

Synonymes: Asclepias nigra L.

Cynanchum nigrum R. Br.

- Vincetoxicum stenolobum Shuttl.

Cette espèce est différente des autres espèces du genre vincetoxicum parce que ses fleurs sont plus grandes, blanches avec les pétales libres et ovales.

Les sépales sont plus petits, libres et arrondis à l'extrémité. Les feuilles sont vert foncé et arrondies ou sub-cordées à la base. La plante est robuste et pousse en Europe moyenne.

4) - Description de Vincetoxicum officinale Moench.

Synonymes : Cynanchum vincetoxicum (L.) Pers.

Asclepias vincetoxicum L.

Cette plante a été appelée Hirundaria herba, c'est à dire l'herbe de l'hirondelle. Ce nom a été donné à cause de la forme des graines qui ont une touffe de soie et quand elles mûrissent, elles s'échappent dans l'air et sont remarquées par les oiseaux. On l'appelle aussi "racine blanche" à cause du rhizome blanc. Dans les pays romans, on l'appelle "fellas de cavall", "toschik" et "tossik". En Yougoslavie on l'appelle "Kokosèvec" ou "divlja paprika", c'est-à-dire le "paprika sauvage" parce que la plante avec ses fleurs et ses fruits ressemble au paprika.

Les fleurs, blanches, sont un peu épaisses, non barbues et en forme d'ombelle simple. Les pédicelles sont trois fois plus longs que les pédoncules.

La plante fleurit de mai à août.

Les feuilles, quand elles sont jeunes, sont ovales, acuminées et finement ciliées sur les bords, tomenteuses et blanchâtres en dessous. Les tiges dressées sont robustes et portent une ligne duveteuse de chaque côté. Elles ont de 30 à 100 cm de hauteur. La plante pousse en Europe.

Rony (28) a décrit plusieurs variétés dont les plus importantes sont les suivantes (29) :

- var. ochroleucum Rouy.

La corolle est jaune, les lobes sont ovales, presque soudés. Les feuilles sont colorées vert assez pâle; dans la partie moyenne de la tige, elles sont largement ovales, souvent un peu en cœur renversé.

La plante est assez commune.

Synonyme : Vincetoxicum ochroleucum (Jordan et Fourreau).

- var. dumeticolum Rouy.

La corolle est blanc-verdâtre à lobes non pointus mais presque échancrés au sommet. La couronne des étamines est blanc-verdâtre.

Les feuilles sont largement ovales, se terminant par une pointe courte.

La plante est assez commune.

Synonyme : Vincetoxicum dumeticolum (Jordan et Fourreau).

- var. laxum G.B.

La corolle est blanche, souvent légèrement verte à la base. La couronne des étamines est jaune pâle, à lobes arrondis et très obtus.

Les feuilles sont ovales allongées.

Les fruits sont allongés et pointus.

La plante est assez rare.

Synonyme : Vincetoxicum laxum G.G.

Cynanchum laxum Bartl.

- var. beugesiacum Rouy.

La corolle est blanche. La couronne des étamines est verte, à lobes ovales et presque aigus au sommet.

Les inflorescences sont fournies et assez serrées.

Les feuilles sont ovales allongées et en forme de coeur renversé à la base de la tige.

La plante est assez rare.

Synonyme : Vincetoxicum beugesiacum (Jordan et Fourreau)

- var. luteolum Rouy.

Les fleurs sont grandes. La corolle est jaune pâle de plus de cinq mm. de longueur. La couronne des étamines est formée de lobes ovales un peu allongés, écartés, réunis entre eux par une membrane translucide. Les feuilles sont vert foncé et cordiformes.

La plante pousse dans les régions des Alpes, des Corbières et des Pyrénées.

Synonyme : Vincetoxicum luteolum (Jordan et Fourreau)

4) - a. Morphologie de Vincetoxicum officinale Moench.

Un groupe sous le nom Vincetoxicum officinale des plantes vivaces, par leurs tiges et leurs rhizomes souterrains, communes dans les bois, sur les coteaux et les rochers, dans

les endroits incultes, arides et pierreux.

- La tige

La tige peut atteindre environ 80 cms de hauteur mais dans des conditions favorables elle atteint 200 cms. Elle est simple, dure et rampante et porte beaucoup de feuilles opposées à court pétiole.

- Les feuilles

Les feuilles opposées, rarement verticillées par trois à quatre garnies de poils sur les bords et sur les nervures, ont un pétiole court ou même à peine distinct, à limbe ovale et très étiré en pointe vers l'extrémité. Celles du milieu de la tige sont arrondies ou en forme de coeur renversé.

- Les inflorescences

Les fleurs qui peuvent être blanches, blanchâtres, jaunes ou jaunâtres (parfois rougeâtres en dehors) apparaissent depuis le mois de mai jusqu'au mois de septembre. Elles sont directement placées sur des pédoncules qui ont à peu près la longueur de la fleur ou sont un peu plus longs, et elles sont groupées en petites grappes contractées qui ont l'aspect d'ombelles simples et qui sont au nombre de deux ou trois. Les ombelles sont groupées sur le rameau qui porte l'inflorescence entière et qui est situé à l'aisselle d'une feuille.

Le calice a cinq divisions ciliées et lancéolées atteignant la gorge de la corolle

La corolle campanulée, blanche et glabre présente cinq divisions profondes. Elle a des lobes le plus souvent sans poils, ovales, arrondis ou obtus.

Les cinq étamines unies par leur filet, forment une sorte de couronne en forme d'écuelle à cinq lobes courts et arrondis au sommet. Dans ces plantes, le pollen est aggloméré en pollinies. Le gynécée est formé de deux carpelles soudés par la partie supérieure des styles fortement dilatée en une tête stigmatique. Chaque loge ovarienne renferme de nombreux ovules descendants et anatropes.

Thilo Irmisch (30) a décrit trois types différents de fleurs de Vincetoxicum officinale :

- les pétales sont soudés seulement à la base.
- les pétales sont soudés complètement.
- les pétales sont complètement libres.

- Le rhizome.

Le rhizome, appelé improprement "racine d'Asclépiade", est une masse tortueuse, irrégulière, mesurant 3 à 6 cms de longueur et 5 à 8 mm. d'épaisseur. Il est jaune rougeâtre et montre sur sa face supérieure les cicatrices produites par la section des tiges aériennes et sur la face inférieure de nombreuses petites racines non ramifiées et cassantes. Les nombreuses racines adventives épaisses et cylindriques, se

perpétuent et se multiplient par des bourgeons nés sur la tige souterraine.

- Le fruit.

Le fruit est une gousse verte mesurant 3 à 8 cms de longueur et 0,5 à 1 cm d'épaisseur. Il est formé de deux follicules divergents, renflés à la base, renfermant de nombreuses graines surmontées d'une aigrette de poils soyeux.

- Les graines.

Les graines brunes sont ovales, mesurant 5 à 8 mms de longueur et 3 à 6 mms d'épaisseur. Leur extrémité pointue porte une touffe de soie de 1,5 à 2cms. de longueur. Cette dernière est très hygroscopique, elle se déploie au contact de l'humidité de l'air. Le vent peut les porter très loin de la plante et faire une propagation rapide de Vincetoxicum officinale.

4) - b. Biogeographie et écologie de Vincetoxicum officinale Moench.

Vincetoxicum officinale Moench. pousse en Asie (Caucase, Tauride), en Afrique (Nord de l'Afrique) en Amérique du nord et surtout en Europe. En Europe, la plante pousse depuis la Péninsule scandinave jusqu'au bords de la Méditerranée, mais elle est rare en Europe orientale. Elle prospère sur les bords calcaires et argileux, mais on peut la trouver aussi sur les bords sableux. Cette espèce est paléotempéré d'origine méditerranéenne (31) mais de nos jours elle se rencontre fréquemment dans les Alpes où elle peut s'élever jusqu'à 1 800m. d'altitude.

Elle est assez commune dans les Alpes Françaises, Italiennes, Suisses, Autrichiennes et Yougoslaves, dans le bassin houiller de Belgique, en Tchécoslovaquie et également en Suède, Finlande et Russie. Elle est rare dans les régions méditerranéennes de France, Espagne, Portugal, Italie et Grèce.

En France, elle est commune dans les Vosges et sur les sols calcaires de Lorraine, en Suisse, dans les régions du Tessin et du Wallise et en Yougoslavie, on la rencontre surtout en Slovenie, partie la plus au nord-ouest de la Yougoslavie, c'est-à-dire au-dessous des Alpes, région où les conditions sont les plus favorables pour la croissance de Vincetoxicum officinale.

En raison de sa grande répartition géographique, il n'existe pas d'association permanente de Vincetoxicum officinale, mais suivant les zones climatiques où elle se trouve, on peut former quelques groupes de plantes vivant avec cette espèce.

Dans les plaines, on la trouve dans l'association du Chrysanthemum corymbosum (32) :

Chrysanthemum corymbosum, Geranium sanguineum, Lithospermum purpureo-coeruleum, Pencedanum cervaria et officinale, Viola hirta, Camptothecium lutescens et Rhytidium rugosum (association de prairie sèche à terrain neutre ou basique).

Dans les vallées de basse altitude, Vincetoxicum officinale pousse dans les forêts feuillées et héliophiles.

Ellenberg (33) le place dans l'ordre d'association de Quercetalia pubercenti-petraeae. C'est une sylve à Colutea arborescens, Cornus mas, Caronilla emerus, Quercus pubescens et Sorbus domestica où Vincetoxicum officinale pousse avec les espèces suivantes :

Campamula persicifolia, Fragaria viridis, Inula conyza, Lathyrus niger, Melittis melissophyllum, Orchis purpurea, Polygonatum odoratum, Potentilla alba, Tripolium alpestre.

Mais on le trouve plus souvent dans les forêts de hêtres, claires, sur les versants secs de pente de 5 à 20° et de 350 à 500 m. d'altitude parmi : Convallaria majalis, Euphorbia amygdaloides, Viola silvatica, Vicia sepium, Tamus communis, Anemone nemorosa, Pulmonaria obscura, Sanicula europaea, Fragaria vesca et Angelica silvestris.

Vincetoxicum officinale est très répandu sur les terrains rocaillieux des Alpes, au milieu d'association de
avec :

Melica ciliata, Silene caerulea, Thlaspi montanum, Coronilla montana, Tenckium montanum et Chamaedrys, Carduus defloratus, Rumex scutatus, Thlaspi rotundifolia, Galeopsis ladanum, Hieracium staticifolium, Satureja nepetoides, Scrophularia canina, etc

Enfin dans tout le domaine subalpin, Vincetoxicum officinale Moench se trouve à la lisière des forêts, sur terrains calcaires, en compagnie de Geranium sanguineum, Origanum vulgare et Tripolium medium (34).

Deuxième Partie

E T U D E C H I M I Q U E

1) - Composition générale

A. - Techniques

Les essais préliminaires ont été effectués sur des échantillons de Vincetoxicum officinale Moench récoltés en Yougoslavie près de Ljubljana. Les feuilles, les tiges, et les racines ont été séchées à la température de 30°C., pulvérisées au mixeur et stockées en boîtes étanches.

Humidité

On porte exactement 2g. de poudre de plante à l'étuve à 37°C. pendant 24 heures puis 24 heures à 60°C. et enfin à 100°C. jusqu'à poids constant.

Cendres

- La poudre séchée à 100°C. est calcinée avec précaution dans une capsule en quartz de 3cm. de diamètre et de 4 cm. de hauteur jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucune partie charbonneuse. Après refroidissement, le résidu est pesé.

On recommence l'opération jusqu'à poids constant.

Indice de mousse

Dans une série de tubes à essais de 16 cm. de long et de 16 mm. de diamètre on introduit des quantités croissantes (1, 2, 3 10cm³) d'infusion et l'on complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée; on bouche et on agite les tubes pendant 15 secondes : la dilution ou la mousse atteint une hauteur de 1 cm. et persiste au moins quinze minutes nous donne l'indice de mousse.

Dosage de l'azote total

La méthode de dosage de l'azote total la plus applicable aux végétaux est celle qui repose sur le procédé de Kjeldhal, procédé qui a subi de nombreuses transformations et améliorations, mais dont le principe essentiel n'a pas été touché. Le principe de la méthode est le suivant : par attaque de la substance végétale avec de l'acide sulfurique concentré, à chaud, en présence de catalyseur (Dumazert et Marcellet), l'azote des composés minéraux et organiques est transformé en sulfate d'ammonium. Par distillation avec un excès de lessive alcaline, l'ammoniac est mis en liberté, entraîné et recueilli dans l'acide sulfurique titré.

L'appareil employé pour la distillation et le dosage de l'ammoniaque est celui de Parnas et Wagner.

Recherche des flavonoïdes

Sur l'extrait alcoolique, on se livre au test de la cyanidine (35) : 1cm³ d'extrait est additionné de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré puis de quelques copeaux de magnésium. Il se développe au bout de quelques minutes une coloration plus ou moins rouge.

Recherche des glycosides cardiotoniques

Sur l'extrait alcoolique, on fait agir le réactif de Baljet (36).

Réactif de Baljet : Solution I = 1,0 g. acide picrique dans 100cm³ d'alcool à 95°.

Solution II = 10,0 g. de soude dans 100cm³ d'eau.

On mélange les solutions I et II avant utilisation.

Quelques gouttes de réactif donnent avec les glycosides cardiotoniques une couleur orange ou rouge.

Recherche des substances stéroliques

On emploie le réactif de Liebermann Burchard (37) : 1mg d'extrait est solubilisé dans quelques gouttes d'acide acétique et on ajoute 3 cm³ du mélange anhydride acétique : acide sulfurique concentré 50 : 1. Il apparaît une coloration violette qui vire au brun-rouge puis au vert.

Recherche des 2-désoxysucres

On peut identifier les 2-désoxysucres par les réactifs de Pesez et de Keller-Kiliani.

Réactif de Pesez (38, 39) : On mélange 10cm³ d'acide acétique, 0,15 cm³ d'une solution à 10% de xanthidrol dans le méthanol et 0,1 cm³ d'acide chlorhydrique concentré.

1 mg d'extrait solubilisé dans 10 cm³ de réactif est porté à ébullition. En présence de 2-désoxysucres, une coloration rouge apparaît.

Réactif de Keller-Kiliani (40) : 1 mg d'extrait est solubilisé dans 5 cm³ d'acide acétique auquel on ajoute une goutte d'une solution de chlorure ferrique à 5% dans l'eau et, avec précaution, 5 cm³ d'acide sulfurique concentré. Dans l'acide acétique une coloration bleue apparaît en présence des 2-désoxysucres.

Recherche des alcaloïdes

Quelques cm³ d'extrait alcoolique sont acidifiés par l'acide sulfurique normal et additionnés de quelques gouttes du réactif de Mayer (41). En présence des alcaloïdes il se forme un précipité blanc.

Etude chromatographique

On utilise les essais préliminaires, la chromatographie sur papier et la chromatographie sur couche mince.
- Chromatographie sur papier = papyrographie.

La première séparation des substances de l'extrait alcoolique est faite par papyrographie.

Cuve de verre Shandon.

Papier Whatman n° 1.

Méthode descendante.

Durée de développement : pendant la nuit = 14 heures

Température : à 22°C. aussi constante que possible.

Solvant : le mélange de Partridge n-butanol-acide acétique-eau = 40-10-50 en volume.

- Chromatographie sur couches minces.

La chromatographie sur couche mince est utilisée pour l'étude des substances extraites, pour vérifier le degré de pureté. La méthode est très rapide et sensible. On peut préparer les couches minces de différentes façons. La technique la plus employée est celle de Stahl (42).

Les plaques de verre d'épaisseur identique (4mm) de 20X20 cm. sont bien lavées et séchées. On étale sur les plaques, avec un appareil (43) une couche mince (0,2mm) du mélange de gel de silice (Kieselgel G. de Merck) et d'eau (44,45). Après l'étalement, on laisse les plaques sur le cadre en matière plastique jusqu'à ce que la surface devienne tout à fait mate. On peut les laisser sécher pendant la nuit à l'air, pour qu'il se forme une couche bien adhérente au verre. Pour beaucoup de travaux, ce genre de plaques suffit (46). Après séchage à l'air, on active les plaques en les portant 30 minutes à 105°C. On les conserve dans un dessiccateur de 30 cm. de diamètre sur un agent desséchant (gel de silice bleu, alumine activée, chlorure de calcium).

V Révélation des taches

Avant et après pulvérisation de réactifs chimiques sur les chromatogrammes, on les observe à la lumière de Wood.

Révélation des glycosides cardiotoniques :

- Réactif de Kedde (47,48).

On dissout 1 g. d'acide 3,5-dinitrobenzoïque dans un mélange de 50 cm³ de méthanol et de 50 cm³ de potasse 2 N.

Les taches des glycosides cardiotoniques se colorent en rouge.

Révélation des glycosides stéroliques :

- Réactif de Gager-Zechner (49).

On mélange 5 cm³ d'acide sulfurique concentré et 15 cm³ d'éthanol à 95% et une goutte de chlorure ferrique à 50% dans l'eau.

Les taches se colorent aussitôt en rouge et après quelques secondes virent au bleu.

- Réactif avec le chlorure d'antimoine (50).

15 g. de chlorure d'antimoine sont dissous dans 100 cm³ de chloroforme. Les taches se colorent en bleu ou en vert.

Révélation des flavonoïdes :

- Réactif au chlorure d'aluminium.

Chlorure d'aluminium en solution éthanolique à 2%.

Les flavonoïdes donnent des taches jaunes.

Perchlorure de fer à 2% dans l'éthanol à 96% : les flavonoïdes donnent des taches vertes.

Révélation des alcaloïdes :

- Réactif de Dragendorff (51)

On utilise le réactif de Dragendorff modifié par Amelink, à l'iodobismuthate de K :

7 g. de IK sont chauffés avec 18 cm³ d'eau et 3 cm³ d'acide chlorhydrique 4 N à ébullition durant laquelle on ajoute petit à petit 15 g. de nitrate basique de bismuth. On étend la solution de la même quantité d'eau. Au moment de l'emploi, on mélange 2 cm³ de cette solution avec 3 cm³ d'acide chlorydrique à 25% et on complète avec de l'eau à 100 cm³.

B. - Résultate

Tableau I. - Composition général de Vincetoxicum officinale

T e s t	Feuilles	Tiges	Racines
Teneur en eau	80%	80%	65%
Cendres totales	5,2%	4,8%	4,2%
Azote total	3,7%	1,6%	1,8%
Protéines (Nx6,25)	23,1%	10,0%	11,2%
Sapronosides	-	-	-
Flavonoïdes	+++	++	+
Substances stéroliques	+	+	+++
Glycosides cardiotoniques	-	-	-
2-désoxysucres	+	+	+++
Alcaloïdes	(+)	(+)	+

Tableau II. - Papyrographie dans le solvant de Partridge d'un
extrait alcoolique des feuilles.

Rf.	Fluorescence U.V.	Fluorescence U.V. - NH ₃	G. Zechner	Dragendorff
0,92	-	-	rouge-bleu	-
0,88	turquoise	bleu	-	-
0,80	bleu	bleu	-	-
0,70	jaune	jaune	-	-
0,65	bleu	bleu-vert	-	-
0,56	brun	jaune	-	-
0,45	brun	jaune	-	-
0,32	bleu	bleu		
0,25	bleu	bleu		

Tableau III. - Papyrographie dans le solvant de Partridge d'un
extrait alcoolique des tiges.

Rf.	Fluorescence U.V.	Fluorescence U.V. - NH ₃	G. Zechner	Dragendorff
0,90	-	-	rouge-bleu	-
0,82	bleu	bleu	-	-
0,68	bleu	bleu-vert	-	-
0,56	brun	jaune	-	-
0,46	brun	jaune	-	-
0,35	bleu	bleu	-	-
0,28	bleu	bleu	-	-

Tableau IV. - Papyrographie dans le solvant de Partridge d'un
extrait alcoolique des racines.

Rf.	Fluorescence U.V.	Fluorescence U.V. - NH ₃	G.Zechner	Dragendorff
0,90	-	-	rouge-bleu	-
0,81	bleu	bleu	-	-
0,70	jaune	jaune	-	-
0,66	bleu	bleu-vert	-	-
0,43	brun	jaune	-	-
0,35	-	-	-	rose
0,30	bleu	bleu	-	-
0,22	bleu	bleu	-	-

Conclusion

Nos essais préliminaires nous montrent que le *Dompte-Venin* *Vincetoxicum officinale* Moench. contient des dérivés flavonoïques, des glycosides stéroliques, des 2-désoxysucres et un peu d'alcaloïdes, mais qu'il ne contient pas de glycosides cardiotoniques. Dans les feuilles, on trouve des dérivés flavoniques, alors que les racines contiennent des glycosides stéroliques en forte teneur.

Notre étude portera spécialement sur les dérivés flavoniques et les glycosides stéroliques.

2) - Les substances polyphénoliques.

En se livrant à la recherche des substances polyphénoliques chez plusieurs centaines d'espèces végétales, Bate-Smith (52) a remarqué par hydrolyse acide de feuilles de Vincetoxicum officinale la présence de quercétine et de kempférol, ce dernier étant mineur.

Nous avons aussi trouvé par essais préliminaires que les feuilles, les tiges et les racines de Vincetoxicum officinale Moench. contiennent des substances polyphénoliques et glycosidiques. Nous avons donc étudié ces substances, en employant la papyrographie pour identifier, purifier et isoler les flavonoïdes et la spectrophotométrie pour les analyses qualitatives, quantitatives et structurales. A notre connaissance, aucune autre Asclépiadacée n'a fait l'objet d'une étude flavonique.

A. - Techniques particulières

a) Chromatographie

On emploie la chromatographie sur papier pour une première identification et purification des substances polyphénoliques. Le papier Whatman n° 1 est utilisé pour la chromatographie analytique et le papier Whatman n° 3 pour la chromatographie préparative .

Différents solvants permettent la purification et la séparation des substances polyphénoliques :

- pour les aglycones une première chromatographie dans l'acide acétique 7% (en volume) élimine les impuretés. Il faut ensuite une deuxième chromatographie dans l'acide acétique 60% pour séparer les flavonoïdes.

- On utilise également le solvant de Partridge ou BAW (n-butanol acide acétique-eau = 40-10-50), le solvant de Forestal (acide acétique-acide chlorhydrique-eau = 30-3-10), acide acétique 15% et acide acétique 60%.

Par exemple : pour la quercétine la chromatographie dans le solvant Forestal donne un Rf. de 0,42 tandis que dans l'acide acétique 60% le Rf. est de 0,33. On peut donc identifier les substances d'après leur Rf. dans les différents solvants. La reproductibilité des Rf. atteint $\pm 0,02$. La localisation des flavonoïdes sur le chromatogramme s'effectue en lumière UV, la couleur étant souvent caractéristique d'une substance ou d'un groupe de substances.

Les mêmes solvants sont utilisés pour une chromatographie préparative.

b) Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et dans l'infra-rouge.

Toutes les analyses structurales et quantitatives à une micro-échelle des flavonoïdes sont faites par spectrophotométrie. Les méthodes spectrales d'identification et de dosage sont les plus rapides, elles sont très sensibles et spécifiques. Par spectrophotométrie on peut faire des analyses moléculaires par comparaison directe avec des produits de référence et des

analyses fonctionnelles, c'est-à-dire recherche de la nature et de la position des substituants sur le squelette flavonique.

Les analyses se font à des fréquences spectrales de 0,2 à 0,4 μ (U.V. moyen et proche) et de 0,4 à 0,8 (visible) avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer U.V. 137 enregistreur, et à des fréquences spectrales de 2 à 15 μ (infra rouge moyen) avec un spectrophotomètre modèle 21 de Perkin-Elmer.

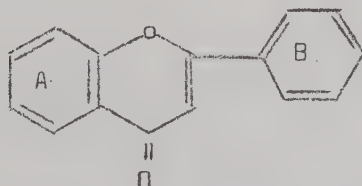
b-1) Analyse qualitative et structurale dans l'ultra-violet et le visible.

Geissman (53), Lebreton (54) et d'autres auteurs donnent de nombreux résultats pour la spectrographie des composés flavoniques. Tous ces résultats permettent de définir quelques règles :

- les composés flavoniques ont deux bandes caractéristiques (dans l'éthanol neutre)

bande I entre 310 et 380 nm caractéristique du cycle A (voir formule)

bande II entre 230 et 270 nm caractéristique du cycle B (voir formule)



- Chlorure d'aluminium (55) en solution éthanolique à 0,6% forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en 5 ou en 3, en provoquant un dédoublement du spectre initial avec un effet bathochrome. En ajoutant cette solution à celle d'un composé flavonique l'effet bathochrome est de 40 à 60 nm sur la bande I. Un déplacement de l'ordre de 40 nm indique un hydroxyle libre en 5, un déplacement de l'ordre de 60 nm indique un hydroxyle libre en 3 (en 5 éventuellement).

- L'acétate de sodium (56) ionise les hydroxyles les plus fortement acides, c'est-à-dire en 7,4' et en 3 en provoquant un effet bathochrome. Un déplacement de la bande II de l'ordre de 5 à 25 nm indique que l'hydroxyle en 7 est libre.

- L'acétate de sodium et acide borique (57).
L'acide borique en présence d'acétate de sodium forme des chélates avec les composés flavoniques possédant des groupements dihydroxylés en ortho. Si les groupements ortho-dihydroxylés sont libres l'acide borique provoque un déplacement de la bande I de 20 nm ou plus.

- Ethylate de sodium (58) est plus alcalin que l'acétate de sodium et ionise tous les groupements hydroxyles quelle que soit leur position. On observe alors un déplacement bathochrome des bandes I et II. La stabilité dans l'éthylate montre l'absence simultanée d'hydroxyles libres en 3 et 4'.

b-2) Analyse quantitative.

La spectrophotométrie est également utilisée pour l'analyse quantitative des flavonoïdes.

Après hydrolyse acide, l'extrait étheré contenant les flavonoïdes est mélangé avec la solution de chlorure d'aluminium et spectrophométré dans l'ultra-violet proche. Comme solution témoin on emploie la solution éthanolique de flavonoïdes. Une mesure différentielle à la longueur d'ordre de la bande I donne un dosage des flavonoïdes totaux (59).

Calcul :

$$DO \times \frac{v \cdot d}{p} \times \frac{M \times 100}{1000 \times \epsilon} = \% \text{ flavonoïdes}$$

avec :

DO	=	densité optique	M	=	masse moléculaire
V	=	volume	ϵ	=	absorption molaire de
d	=	dilution			la solution de flavonoïde
p	=	poids de matériel végétal			

Par exemple :

Le teneur globale des flavonols :

M = 292 (quercétine)

ϵ = 23 000

$$DO \times \frac{v \cdot d}{p} \times \frac{292 \times 100}{1000 \times 23\ 000} = \% \text{ de flavonols}$$

$$\text{ou } DO \times \frac{v \cdot d}{p} \times 1,27 \times 10^{-2} = \% \text{ de flavonols}$$

Lorsqu'il y a deux ou plusieurs flavonols en mélange, il faut faire une chromatographie, puis photométrer les bandes à 365 nm (ou 425 avec le chlorure d'aluminium) pour mesurer leurs teneurs relatives. Ensuite, on multiplie par les valeurs relatives le dosage total.

b-3) Analyse qualitative et structurale dans l'Infra-rouge.

La spectrophotométrie dans l'infra-rouge est employée pour l'analyse structurale des substances, car elle donne des bandes d'absorption très spécifiques. Mais, pour relever un spectre I.R. il faut disposer de 1 mg au moins de produit pur et cristallisé. La spectrophotométrie I.R. des flavonoïdes est encore à ses débuts et l'interprétation des spectres I.R. est difficile. Les résultats de Lebreton (60) et Ribereau-Gayon (61) permettent les principales attributions suivantes :

- bande O H : 3300 cm^{-1} pour les hydroxyles libres de liaisons intramoléculaires;
 3100 cm^{-1} (2600 cm^{-1}) pour les hydroxyles liés (ponts hydrogènes intramoléculaires notamment hydroxyles en 5 ou 3 avec le carbonyle en 4);
- bande C H₃ : 2930 cm^{-1} , masquée le plus souvent par la bande hydroxyle;
- bande =C-O : 1685 cm^{-1} pour le carbonyle en 4 conjugué avec le noyau A seulement (flavonones, s'abaissant à 1650 cm^{-1} chez les hydroxy-5 flavonones;

1655 cm^{-1} pour le carbonyle conjugué avec les noyaux A et B (dihydroxy - 5,7 flavones) mais 1630 cm^{-1} seulement chez les hydroxy-7 flavones; abaissement supplémentaire éventuel de 30 cm^{-1} entre flavone et flavonol homologues;

- bandes phényle : bandes corrélatives 1610 et 1500 cm^{-1} des doubles liaisons aromatiques; bande 1585 cm^{-1} , phényle conjugué avec une double liaison extranodale;
- bande des OH phénoliques : 1365 cm^{-1} pour la fréquence principale; éventuellement seconde bande vers 1190 cm^{-1} ;
- bande de l'enchaînement
= C-O- : 1240 cm^{-1} , non spécifique car se trouvant au niveau de l'oxygène hétérocyclique et des fonctions phénols, libres ou méthylées;
- bande de la m-di =
substitution : 1165 cm^{-1} (dihydroxy - 5,7 flavonoïdes par exemple);

La région des fréquences inférieures à 1000 cm^{-1} , relative aux modes de vibration des hydrogènes est complexe et peu attribuable en fait; cependant à 835 cm^{-1} , fréquence de vibration des hydrogènes aromatiques isolés.

B. - Résultats

a) Identification et dosage des composés flavoniques

On traite 3 g. de matériel végétal sec par l'acide chlorhydrique 2N au bain-marie bouillant pendant quarante minutes. L'hydrolyse est apparemment complète et libère les aglycones flavoniques et les sucres. On refroidit le mélange sous l'eau froide et on extrait ensuite les aglycones flavoniques par l'éther, ce qui fournit l'extrait I. La phase acide résiduelle est de même extraite par du n-butanol, fournissant l'extrait II qui contient les anthocyanes (provenant des leucoanthocyanes).

L'extrait I est évaporé et le résidu est dissous dans 10 cm³ éthanol 95°.

L'extrait II est concentré ou amené à un volume connu.

- Les feuilles

On dilue 0,01 cm³ de la solution éthanolique des aglycones flavoniques dans 10 cm³ d'éthanol et 0,01 cm³ de la même solution dans 10 cm³ de solution éthanolique de chlorure d'aluminium à 0,6%. On mesure la densité optique différentielle des deux solutions à 430 nm.

$$\begin{aligned} \text{\% de composés flavoniques} &= 1,27 \cdot 10^{-3} \times DO \times \frac{v \cdot d}{p} = \\ &= 1,27 \cdot 10^{-3} \times 0,25 \times \frac{10 \times 1000}{3} = \\ DO &= 0,25 &= \frac{1,27 \times 0,25}{3} = \\ v &= 10 &= \frac{1,27 \times 0,25}{3} = \\ d &= 1000 &= \frac{1,27 \times 0,25}{3} = \\ p &= 3 &= \underline{\underline{1,04\%}} \end{aligned}$$

Les feuilles sèches de Vincetoxicum officinale contiennent donc 1,04% de composés flavoniques, exprimés comme quercétine. Par ailleurs, des traces d'anthocyanes sont décelées à 550 nm.

- Les tiges

On dilue 0,1 cm³ de la solution éthanolique des aglycones flavoniques des tiges dans 10cm³ d'éthanol et 0,1cm³ dans 10 cm³ de solution éthanolique de chlorure d'aluminium. On mesure la densité optique différentielle.

$$\begin{aligned} \text{\% de composés flavoniques} &= 1,27 \cdot 10^{-3} \times DO \frac{v \cdot d}{p} = \\ DO &= 0,07 &= 1,27 \cdot 10^{-3} \times 0,07 \frac{10 \times 100}{3} = \\ v &= 10 &= \frac{1,27 \times 0,07}{3} = \\ d &= 100 &= \underline{\underline{0,03\%}} \\ p &= 3 \end{aligned}$$

Les tiges sèches de Vincetoxicum officinale contiennent donc 0,03% de composés flavoniques, exprimés en quercétine. Il y a également des traces d'anthocyanes.

- Les racines

Les racines de Vincetoxicum officinale contiennent seulement des traces de composés flavoniques et ne contiennent pas d'anthocyanes.

Par papyrographie des solutions éthanoliques des aglycones flavoniques des feuilles et des tiges dans l'acide acétique 60%, on obtient deux taches jaunes observées en U.V., $Rf_1 = 0,38$ et $Rf_2 = 0,50$. La deuxième tache chromatographique est très faible.

Pour isoler ces deux substances on fait une chromatographie préparative d'abord dans l'acide acétique 7% pour éliminer les impuretés, ensuite dans l'acide acétique 60% pour développer le chromatogramme. Les deux taches chromatographiques sont éluées par l'éthanol et soumises à spectrophotométrie U.V.

Le spectre U.V. de la tache $Rf_1 = 0,38$ présente dans l'éthanol neutre les caractéristiques suivantes :

deux maxima :

Bande I 378 nm

Bande II 258 nm

deux minima :

243 nm et 287 nm

Action de différents réactifs :

- Chlorure d'aluminium :

En ajoutant la solution alcoolique de chlorure d'aluminium à la solution alcoolique d'aglycone, l'effet bathochrome entre la bande I et Ia est de l'ordre de 61 nm; ce qui montre que l'hydroxyle en 3 est libre.

Bande I a 439 nm

- Acétate de sodium et acide borique :

En contact avec la solution d'aglycone, provoquent un déplacement bathochrome de 22 nm sur la bande I; les o-dihydroxyes en 3' et 4' sont libres.

- Ethylate de sodium :

provoque avec la solution d'aglycone un déplacement bathochrome des bandes I et II; leur instabilité montre la présence d'hydroxyes libres en 3 et 4' simultanément.

La quercétine témoin sous l'influence de ces mêmes réactifs subit les mêmes modifications. On peut penser que la substance de $Rf_1 = 0,38$ est identique à la quercétine = pentahydroxy-3, 3', 4', 5,7 flavone = tétrahydroxy-3',4',5,7 flavonol.

Le spectre U.V. de la tache de $Rf_2 = 0,50$ présente dans l'éthanol neutre les caractéristiques suivantes :

deux maxima :

Bande I 374 nm

Bande II 268 nm

deux minima : 240nm et 230nm

Action des différents réactifs :

- Chlorure d'aluminium :

L'effet bathochrome entre bande I et Ia est de l'ordre de 52 nm, ce qui montre que l'hydroxyle en 3 est libre :

bande Ia 426 nm

- Acétate de sodium et acide borique :

On n'observe pas de déplacement bathochrome; il n'y a pas de groupement ortho-dihydroxylés.

- Acétate de sodium :

L'effet bathochrome sur la bande II est de l'ordre de 16nm, ce qui montre que l'hydroxyle en 7 est libre.

bande IIa 284 nm

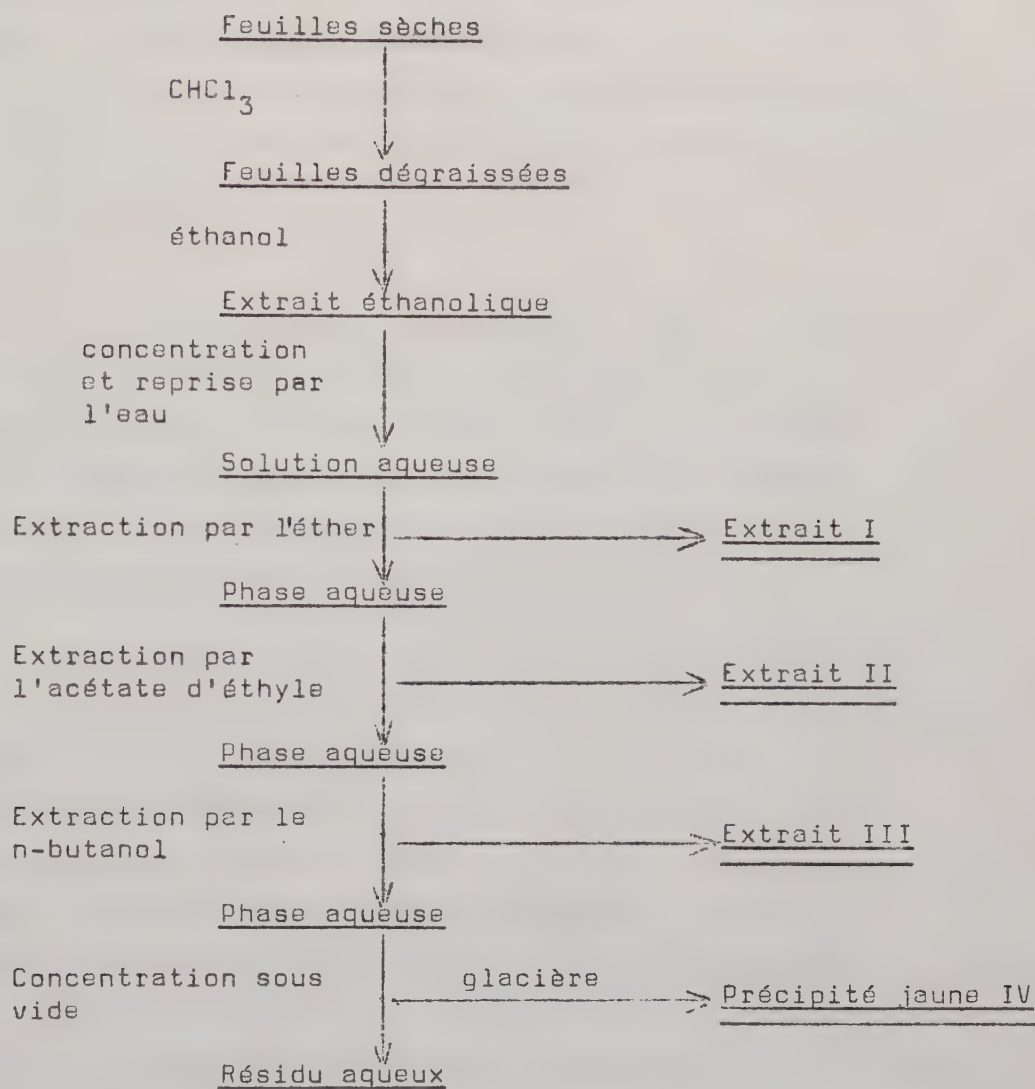
Le kempférol témoin sous l'influence de ces mêmes réactifs subit les mêmes modifications. On peut penser que l'aglycone de la tache $Rf_2 = 0,50$ est identique au kempférol = tétrahydroxy-3,4',5,7 flavone = trihydroxy-4',5,7 flavonol.

Par photométrie et planimétrie de ces deux taches chromatographiques on observe que la concentration de la quercétine est neuf fois plus grande que celle du kempférol.

Les feuilles et les tiges de Vincetoxicum officinale Moench. contiennent de la quercétine et du kempférol sous forme liée ou libre, dans les proportions 9 : 1.

b) Extraction des substances polyphénoliques

L'extraction des glycosides flavoniques est fait selon le schéma de Nétien et Lebreton (62) :



300 grammes de feuilles sèches de Vincetoxicum officinale sont préalablement traités par le chloroforme anhydre au Soxhlet, pour éliminer le chlorophylle, les résines,

et les autres substances lipophiles. Le matériel dégraissé est ensuite traité par l'éthanol pendant deux jours et l'extrait éthanolique est concentré à consistance sirupeuse par évaporation sous pression réduite. On reprend par 300 cm³ d'eau bouillante, on filtre et on laisse au repos pendant vingt-quatre heures à la glacière.

La solution aqueuse est épuisée à dix reprises par 250 cm³ d'éther, fournissant l'extrait I. La phase aqueuse est de même extraite à cinq reprises par 250 cm³ d'acétate d'éthyle, fournissant l'extrait II. La phase aqueuse est ensuite extraite à six reprises par 200 cm³ de n-butanol fournissant l'extrait III.

Les extraits I et II s'évaporent spontanément à l'air et ne contiennent que peu de substances par rapport à l'extrait III. Celui-ci est soumis à l'évaporation sous pression réduite. L'extrait III sec est repris par 100 cm³ d'eau bouillante, filtré et après addition de 100 cm³ d'éthanol il est laissé pendant vingt-quatre heures à la glacière. Par filtration on obtient 1,417g. de précipité jaune.

La solution aqueuse après extraction par le n-butanol est laissée à la glacière. Après une semaine on obtient 0,635g. d'un composé jaune qui se révélera identique au précipité de l'extrait III. Le matériel végétal est traité après l'extraction par l'éthanol, par l'éthanol : eau 1:1. L'extrait obtenu

est traité comme l'extrait éthanolique. On obtient les extraits Ia, IIa et IIIa qui contiennent les mêmes substances que les extraits I, II et III. L'extrait IIIa donne après repos à la glacière 0,512g. de précipité jaune et l'eau résiduelle 0,311g. qui ont été ajouté au précipité d'extrait III.

Au total, on obtient donc :

$1,417g + 0,635g + 0,512g + 0,311g = \underline{2,875g}$ de glycoside flavonique majeur de Vincetoxicum officinale soit près de 1%. Comme nous le verrons plus bas, ce composé est un dihéterside et nous l'avons donc extrait avec un rendement de 50% environ.

c) Etude de la substance polyphénolique majeur ou Glycoside A.

Le précipité recueilli présente une réaction positive au test de la cyanidine, caractéristique des flavones.

Purification

Des essais sont fait dans l'alcool 95%, dans l'alcool 50% et dans l'acide acétique 20% (63). La meilleure recristallisation est obtenue dans l'alcool 95%. La solution alcoolique est évaporée jusqu'à apparition d'un léger trouble et laissée 24 heures à la glacière. Le précipité formé est recueilli par filtration et séché une demi-heure à l'étuve à 105°C puis dans un dessiccateur. Par passage sur colonne de polyamide on élimine les impuretés et sépare les différents flavonoïdes (64, 65).

Le précipité dissous dans l'eau-alcool 50% est passé sur une colonne de polyamide. Le produit est élué par l'eau-alcool 50%. Tandis que les impuretés brunes restent sur la colonne, le produit s'élue aisément. On procède à une recristallisation finale dans l'alcool 95%.

On observe une seule tache par chromatographie : le produit est donc pur.

C'est une poudre jaune constituée d'aiguilles fines sans odeur ni saveur.

Point de fusion

Il est déterminé sur banc chauffant et au microscope à platine chauffante (Kofler);

- sur banc chauffant le point de fusion est égal à 235°C;
- au microscope à platine chauffante on observe deux points de fusion : à 180° - 182°C et à 227° - 230°C.

Solubilité

Insoluble dans l'éther de pétrole, l'éther éthylique, peu soluble dans l'acétate d'éthyle et l'acétone, assez soluble dans l'éthanol, très soluble dans l'eau chaude et le n-butanol.

Spectre ultra-violet

Le produit dissous dans l'éthanol à 95% présente le spectre d'absorption U.V. suivant :

deux maxima :

Bande I 366nm

Bande II 259nm

ressaut à 270nm.

deux minima :

à 300nm et à 240nm

Spectre infra rouge

Le spectre d'absorption dans l'infra-rouge du produit solide (pastille dans le bromure de potassium) présente les caractéristiques suivantes :

- 3,01 μ ou 3320 cm^{-1} = bande des OH libres (sucre notamment et phényle latéral);
- 6,06 μ ou 1650 cm^{-1} = bande des carbonyles chélatés par un hydroxyle en 5;
- 6,27 μ ou 1595 cm^{-1} = bande des phényles
- 6,72 μ ou 1488 cm^{-1} = bande des phényles
- 6,96 μ ou 1437 cm^{-1} = bande aromatique
- 7,72 μ ou 1290 cm^{-1} = bande du groupement éther-oxyde
- 8,34 μ ou 1200 cm^{-1} = bande OH phénolique
- 8,57 μ ou 1165 cm^{-1} = bande de la m-disubstitution.

Par papyrographie et chromatographie sur couche mince de polyamide (66), on observe seulement une tache

avec les valeurs de Rf suivantes :

	B A W	AcOH 15%	1cOH 60%	Sur couche mince de polyamide
Glycoside A :	0,40	0,61	0,70	0,54
Rutine :	0,45	0,53	0,68	0,34

BAW = n-butanol : acide acétique : eau = 40 : 10 : 50 (en volume)

AcOH 15% = acide acétique 15% (en volume)

AcOH 60% = acide acétique 60% (en volume)

Polyamide = eau : éthanol : méthyléthylcétone : acétylacétone =
13 : 3 : 3 : 1

Etude de l'aglycone

L'hydrolyse du glycoside A est faite par traitement à l'acide chlorhydrique 2N au bain-marie bouillant pendant 40 minutes. L'aglycone est extrait par l'éther après refroidissement de l'hydrolysate. L'éther est évaporé à l'air et le résidu recueilli par l'éthanol.

Papyrographie :

Le BAW donne une tache d'un Rf de 0,74

L'acide acétique donne une tache d'un Rf de 0,32

Les Rf sont identiques aux Rf de la quercétine témoin.

Le spectre U.V. de l'aglycone dans l'éthanol neutre présente :

Deux maxima :

Bande I 378 nm

Bande II 258 nm

Deux minima :

à 243 nm et à 287 nm

Un déplacement de la bande I de 60 nm avec chlorure d'aluminium montre que OH en 3 est libre

Un déplacement de la bande II de 20nm avec l'acétate de sodium montre que OH en 7 est libre.

Un déplacement de la bande I de 16nm avec l'acétate de sodium et acide borique montre que OH en 3' et 4' sont libres.

Le spectre J.R. de l'aglycone du glycoside A est identique à celui de la quercétine témoin (62).

On peut conclure que l'aglycone de glycoside A des feuilles de Vincetoxicum officinale Moench par ses propriétés physico-chimiques est idantique à la quercétine témoin.

Etude des sucres

- Nature des sucres.

L'hydrolisat acide après l'extraction de l'aglycone par l'éther contient les sucres du glycoside A. Il est neutralisé par passage une colonne de Permutite A 300 D et concentré à 2-3 cm³. La papyrographie en présence de sucres témoins après la révélation par le phtalate d'aniline (67)

montrer les valeurs de Rf suivantes :

Substance	Solvant 1	Solvant 2	Solvant 3
Hydrolysât	0,17	0,40	0,47
	0,37	0,63	0,62
Glucose	0,18	0,37	0,48
Rhamnose	0,37	0,64	0,62
Galactose	0,16	0,42	0,42

Solvant 1 : B A W

Solvant 2 : Phénol saturée d'eau (68)

Solvant 3 : n-butanol-pyridine-eau = 3 : 4 : 2 (69)

La séparation est faite avec différents solvants pour identifier le glucose qui a des valeurs de Rf très proches de celles du galactose. Les chromatogrammes nous montrent que le glycoside A contient du glucose et du rhamnose. Cette identification sera confirmée par l'hydrolyse enzymatique (voir ci-dessous).

- Détermination du nombre de molécules des sucres.

Quatre méthodes permettent de déterminer le nombre de molécules des sucres :

- doser l'aglycone dans l'hétéroside;
- doser les sucres;
- déterminer le spectre U.V. spécifique ($E_{1\%}$);
- effectuer la chromatographie sur couche mince de polyamide.

- Détermination de pourcentage d'aglycone dans l'hétéroside

20,4 mg de glycoside sont hydrolysés par 20 cm³ d'acide sulfurique 4N pendant une heure au bain-marie bouillant. Le précipité apparu est filtré et lavé à l'eau distillée. La solution acide est extraite par l'éther, l'éther évaporé et le résidu rassemblé avec le précipité. Celui-ci est dissous dans l'éthanol et dosé au spectrophotomètre.

20,4 mg de glycoside A donnent après l'hydrolyse 9,8 mg d'aglycone soit 48%.

Théorie : 60,4% pour un monohexoside et
46,8% pour un diglycoside dihydraté comme la
rutine.

Ce résultat est en faveur d'un diglycoside.

- Dosage des sucres

Après l'hydrolyse par l'acide sulfurique les sucres restent dans la solution acide. Celle-ci est neutralisée, concentrée et chromatographiée. La révélation par le phtalate d'aniline montre deux taches brunes de mêmes Rf que le glucose et le rhamnose témoin. Le dosage des sucres est fait par photométrie du chromatogramme au "Chromoscan Joyce-Laeb1" (filtre bleu) et planimétrie des pics. De la rutine est traitée de même comme substance étalon.

Les deux taches de notre glycoside contiennent glucose et rhamnose dans le rapport 1,10 : 1.

Le glycoside A est donc en fait un glycoside de rhamnose et de glucose dans un rapport équimoléculaire.

- Le spectre U.V. spécifique

L'absorption U.V. d'un hétéroside flavonique est essentiellement due à l'aglycone, tandis que les sucres n'absorbent pas dans l'ultra-violet proche. Ceci permet de faire l'identification d'un aglycone, d'un mono, di ou tri glycoside. L'absorption spécifique diminue progressivement lorsque l'on passe de la flavone libre à ses monoglycosides puis à ses diglycosides ou triglycosides.

Par exemple, la quercétine et ses hétérosides donnent les absorptions U.V. suivantes (62) :

quercétine	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	à 375 nm	=	710
isoquercitrine	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	à 362 nm	=	346
quercitrine	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	à 362 nm	=	384
rutine	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	à 362 nm	=	278

Le glycoside A de Vincetoxicum officinale qui est aussi un hétéroside de la quercétine présente une absorption :

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} \quad \text{à} \quad 362 \text{ nm} \quad = \quad 310$$

De ce résultat un triglycoside de la quercétine est formellement exclu.

- La chromatographie sur polyamide

Par chromatographie sur couche mince de polyamide on peut déterminer s'il s'agit d'un mono, di ou tri glycoside de flavone (70). Entre les glycosides et le polyamide se forment des ponts hydrogènes. La force avec laquelle les glycosides phénoliques sont retenus par le polyamide dépend surtout du nombre et de la position des groupements hydroxyles des glycosides et non de l'aglycone.

Préparation des plaques :

On agite 5 g de polyamide avec 45 cm³ de méthanol-chloroforme (3 : 2) et on procède à l'étalement avec l'appareil "Desaga"; on laisse les plaques sécher à l'air.

Solvant :

Eau : éthanol : methylethylcetone : acetylacetone = 13 : 3 : 3 : 1.

Dans ce solvant les aglycones ne migrent pas, les monoglycosides ont un Rf de 0,20, les diglycosides en 3 ont un Rf de 0,35 et les triglycosides un Rf de 0,62 et plus(70).

Le glycoside A migre sur la couche mince de polyamide à un Rf de 0,54, ce qui exclut formellement un monoglycoside.

En conclusion, le glycoside A est un diglycoside du glucose et du rhamnose.

- Position des deux sucres

-Position des hydroxyles phénoliques de la quercétine libres et combinés.

Le glycoside A est composé de quercétine, de glucose et de rhamnose en quantités équimoléculaires. On peut déterminer les hydroxyles phénoliques libres ou combinés par action de différents réactifs sur le spectre U.V., par méthylation et par hydrolyse enzymatique du glycoside A.

Les spectres U.V. dans différents milieux ont les caractéristiques suivantes :

Réactifs	Bandes I et II	Déplacement
Ethanol neutre	366nm et 259 nm	
Acétate de sodium	427nm et 266 nm	Bande II + 7nm
Chlorure d'aluminium	412nm et 272 nm	Bande I + 46nm
Borate de sodium	385nm et 264 nm	Bande I + 19nm
Ethylate de sodium	410nm et 275 nm (assez stable)	

L'addition d'une solution alcoolique de chlorure d'aluminium à la solution éthanolique du glycoside A provoque un déplacement bathochrome de 46nm sur la bande I. L'hydroxyle en 5 est donc libre alors que l'hydroxyle en 3 est bloqué, ce que confirme aussi la couleur brune et non jaune de la tache en U.V.

Le déplacement de la bande I de 19nm avec l'acétate de sodium et l'acide borique montre que les hydroxyles en 3' et 4' sont libres.

Par addition d'acétate de sodium, un léger effet bathochrome (6 à 7 nm) est observé sur la bande II, ce qui peut laisser penser que l'hydroxyle en 7 est libre. Cependant, pour divers hétérosides en 3 (rutine, quercitrine, isoquercitrine, avicularine et hypéroside) où l'hydroxyle en 7 est effectivement libre ce déplacement atteint environ 20 nm. Pour le glycoside A la question de l'hydroxyle en 7 reste donc ouverte.

A ce stade des recherches, deux hypothèses de structure pour le glycoside A de Vincetoxicum officinale sont possibles :

- ou bien l'hydroxyle en 7 est libre et le glycoside A est donc un diglycoside (rhamnose et glucose) en 3 de la quercétine, mais différent de la rutine comme le démontre par comparaison les spectres IR et UV (le déplacement avec l'acétate de sodium), les points de fusion, les pouvoirs rotatoires, les spectres de diffraction X, les valeurs de Rf sur couche mince de polyamide;
- ou bien les deux hydroxyles en 3 et en 7 sont bloqués par les deux sucres (rhamnose et glucose).

Pour trancher entre les deux possibilités, on doit effectuer une méthylation suivie d'une hydrolyse acide et d'une étude de l'aglycone méthylé.

- Méthylation

100mg de glycoside A sont dissous dans 50 cm³ d'acétone anhydre. Dans la solution on ajoute 500mg de sulfate

de méthyle, 700 mg de carbonate de potassium anhydre et on laisse réagir pendant 15 heures à reflux. Après refroidissement la solution jaune est filtrée et évaporée sous vide. Le résidu sec est repris par 10cm³ d'acide chlorhydrique 2N, et hydrolysé pendant une heure au bain-marie bouillant. Le précipité apparu est recueilli par filtration, bien lavé à plusieurs reprises par de l'eau distillée et séché sous vide. Les spectres U.V. avec les différents réactifs sont les suivants :

Réactifs	Bandes I et II	Déplacement
Ethanol neutre	375 nm et 258 nm	
Chlorure d'aluminium	436 nm et 270 nm	bande I 61nm
Acétate de sodium	396 nm et 279 nm	bande II 21nm
Borate de sodium	377 nm et 257 nm	
Ethylate de sodium	412 nm et 266 nm (stable)	

Un déplacement bathochrome de 61nm de la bande I avec le chlorure d'aluminium montre que l'hydroxyle en 3 est libre.

Avec l'acétate de sodium on observe un déplacement de 21 nm de la bande II. On peut en conclure que l'hydroxyle en 7 est libre.

Avec l'éthylate de sodium, le spectre U.V. est très stable. L'hydroxyle en 3 étant libre, celui en 4' est donc bloqué. Ceci est confirmé par l'absence de déplacement bathochrome avec l'acétate de sodium et l'acide borique.

Enfin, une fluorescence jaune verte brillante très caractéristique (comme, par exemple, pour l'azaléatine ou méthyl-5 quercétine) montre que l'hydroxyle en 5 est méthylé.

Nous sommes donc en présence de la triméthyl-5,3',4' quercétine, que nous pouvons comparer à de la tétraméthyl-5,7,3',4' quercétine témoin du point de vue chromatographique et spectrophotométrique.

Chromatographie :

Substance	Les valeurs de Rf dans	
	BAW	AcOH 60%
Quercétine	0,74	0,34
Triméthyl-5,3',4' quercétine	0,73	0,52
* Tétraméthyl-5,7,3',4' quercétine	0,78	0,62

Point de fusion :

- sur banc chauffant le point de fusion est égal à 210°C
- au microscope à platine chauffante le point de fusion est de 207 à 210°C.

Spectre infra-rouge de la triméthyl-5,3',4' quercétine (voir fig. I).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature les caractéristiques de ce produit.

* Nous remercions vivement Mlle G. DELLAMONICA (Faculté des Sciences de LYON) pour les échantillons de tétraméthyl-5,7,3',4' quercétine obtenues à partir de la rutine.

Par conséquent, les deux OH en 3 et 7 du glycoside A n'ayant pas été méthylés, c'est qu'ils étaient combinés avec les sucres dans l'hétéroside naturel :

La seconde hypothèse structurale est donc la bonne.

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de polyamide confirment notre hypothèse, car les diglycosides en 3 et 7 migrent plus loin que les diglycosides en 3 (70).

Par exemple :	Les valeurs de Rf	
	littérature	trouvé
Rutine	0,29	0,34
Diglycoside en 3 du kempférol	0,27	0,30
Glycoside A	-	0,54

- Détermination de la position de chaque sucre

Le glycoside A se compose de la quercétine, du glucose et du rhamnose liés sur les hydroxyles en 3 et en 7. Il existe donc deux possibilités :

- soit le glucose est en 7 et le rhamnose en 3. Ce glycoside est probablement présent chez *Celastrus hypoglauca* (71);

- soit le glucose est en 3 et le rhamnose en 7. Il s'agit d'un glycoside nouveau.

Nous avons utilisé, pour déterminer les positions du glucose et du rhamnose l'hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase. La β -glucosidase coupera la liaison entre l'aglycone et le glucose donnant un monorhamnoside de la quercétine dont la structure propre nous donnera la réponse cherchée.

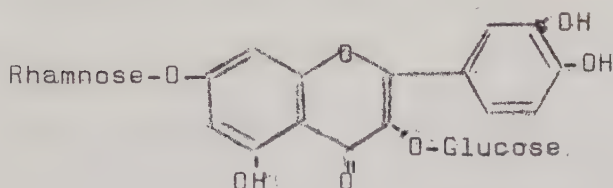
100mg de glycoside A sont dissous dans 100cm³ de tampon d'acétate pH = 5,0 (72,73) par chauffage au bain-marie. Après refroidissement on ajoute 200mg de la β -glucosidase N.B.C. La solution est portée pendant 24 h. à l'étuve à 37°C avec agitation magnétique. On laisse refroidir la solution à la température ambiante. Le rhamnoside de la quercétine précipite. On le filtre, lave à l'eau distillée et on le sèche une demi-heure à l'étuve à 105°C.

La papyrographie du précipité donne une tache de fluorescence jaune. L'hydroxyle en 3 est donc libre, ce que confirme aussi l'effet bathochrome du chlorure d'aluminium sur la bande I (60nm). La glucose se trouve donc en 3, et le rhamnose en 7 par conséquent. Le spectre U.V. de la rhamnosyl-7 quercétine présente avec l'acétate de sodium un déplacement de la bande II de 4 m. Nous rencontrons donc pour la seconde fois une anomalie de comportement spectral, due vraisemblablement au rhamnose. Notons à ce sujet que, parmi tous les hétérosides en 3 de la quercétine, la quercitrine (rhamnosyl-3 quercétine) absorbe à 355 nm seulement et non à 365nm.

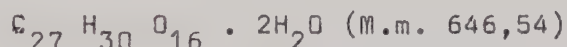
Le glycoside A des feuilles de Vincetoxicum officinale Moench. est donc de la glucosyl-3 rhamnosyl-7 quercétine.

Il s'agit d'une substance nouvelle, qui n'avait pas encore été rencontrée dans la nature; on a déjà trouvé par contre le glycoside équivalent du kempférol, c'est-à-dire le rhamnosyl-7 glucosyl-3 kempférol (74).

La formule chimique du glycoside A est donc :



L'analyse élémentaire montre qu'il cristallise avec deux molécules d'eau. Sa formule est donc :



Calculé : C = 50,15% ; H = 5,31%

Trouvé : C = 50,19% ; H = 5,36%

Les propriétés physico-chimiques sont les suivantes :

Points de fusion :

- sur banc chauffant : 235°C
- au microscope : 130° à 132°C et 227° à 230°C

Pouvoir rotatoire :

$$[\alpha]_D^{20} = -110 \text{ (dans l'éthanol 75\%)}$$

Spectre U.V. $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 362nm = 310 ; à 260nm = 393

d'où ϵ à 362nm = 20 040 ; à 260nm = 25 550

soit ϵ log à 362nm = 4,30 ; à 260nm = 4,38

Spectre J.R. (voir figure II).

Spectre de diffraction X^{*} (voir figure III) (76).

Spectre de R.M.N. ^{**} (voir figure IV)

Le spectre de R.M.N. a été aimablement déterminé par MM. K.R. Karkham et T.J. Mabry après détermination chimique de la structure. Les résultats confirment celle-ci :

1,20 ppm : CH₃ du rhamnose;

5,25 ppm : H-1 du rhamnose, caractéristique d'une substitution en 7; une substitution en 3 conduira à la valeur 5,05ppm seulement(75)

5,85 ppm : H-1 du glucose, caractéristique d'une substitution en 3; une substitution en 7 conduira à la valeur 5,0ppm seulement(75).

Nous proposons pour le glycoside isolé des feuilles de Vincetoxicum officinale Moench. le nom de

vincétoxicoside A

* Nous remercions vivement MM. Jencek et Zajc (Institut des recherches de matériel, LJUBLJANA) pour ce spectre.

** Nous remercions vivement MM. K.R. Karkham et T.J. Mabry (The University of Texas, The Department of Botany, Austin) pour ce spectre.

^E
d) Etude des substances polyphénoliques mineures.

Extrait I

Par papyrographie dans l'acide acétique 60% de l'extrait I on observe deux taches jaunes en U.V. La première tache a un Rf de 0,33; elle est plus forte que la deuxième, de Rf de 0,46. L'identification des taches par action de différents réactifs sur le spectre U.V. montre que :

- la tache de Rf 0,33 a les mêmes caractéristiques spectrales que la quercétine témoin;

- la tache de Rf 0,46 a les mêmes caractéristiques spectrales que le kempférol témoin.

Le rapport des concentrations est :

quercétine : kempférol = 6 : 1

Dans les feuilles de Vincetoxicum officinale Moench. on trouve donc un peu de quercétine et de kempférol libres.

Extrait II

La solution alcoolique de l'extrait II présente un spectre U.V. très caractéristique de l'acide chlorogénique. L'extrait II est dissous dans quelques cm³ d'acétate d'éthyle et additionné de 100 cm³ de chloroforme. Après 40 h. de repos au réfrigérateur, un précipité est apparu; il est récupéré par centrifugation. Le précipité ainsi recueilli est chromatographié dans l'acide acétique 15%.

Résultats :

<u>Substances</u>	<u>Rf</u>	<u>fluorescence</u>	<u>Spectre U.V.</u> (éthanol neutre)
Substance "B"	0,16	jaune	376nm et 259 nm
Substance "C"	0,22	jaune	362nm et 252 nm
Substance "D"	0,42	brune	366nm et 259 nm
Substance "E"	0,51	brune	360nm et 259 nm
Substance "F"	0,88	bleue	332nm et 245 nm (305nm)

L'extrait II des feuilles de Vincetoxicum officinale se compose de cinq substances. La séparation de ces substances est réalisée par chromatographie préparative dans l'acide acétique 15%. Les taches des substances B, C, D, E, et F bien séparées sont éluées par de l'éthanol à 95%.

Etude de la substance B

L'éluat B est amené à 5cm³ par évaporation sous vide. Après addition de 5cm³ d'eau distillée on laisse reposer vingt-quatre heures au réfrigérateur. On filtre le précipité jaune apparu, on le lave à l'eau distillée et on le sèche une demi-heure à l'étuve à 105°C. Nous avons obtenu ainsi 43mg de substance B cristallisée. C'est une poudre jaune constituée d'aiguilles fines sans odeur ni saveur. Elle donne une réaction positive au test de la cyanidine, caractéristique des flavones.

Point de fusion :

- sur banc chauffant ; 270°C
- au microscope à platine chauffante : 265° à 268°C.

Solubilité :

insoluble dans l'éther de pétrole, assez soluble dans l'éther éthylique, l'éthanol et l'acétate d'éthyle, très soluble dans l'eau chaude.

Spectre U.V. :

La substance B dissoute dans l'éthanol neutre à 95% présente le spectre d'absorption dans l'ultra-violet suivant :

- deux maxima :

Bande I 376 nm

Bande II 259 nm

- deux minima :

à 310 nm et 240 nm

Spectre I.R. :

On observe les principales fréquences d'absorption suivantes :

- 3,01 μ ou 3340 cm^{-1} : bande de OH libres
- 6,04 μ ou 1665 cm^{-1} : bande de carbonyle chélaté des hydroxy-5 flavonoïdes

- 6,27 μ ou 1595 cm^{-1} : bande des phényles
- 6,65 μ ou 1500 cm^{-1} : bande des phényles
- 7,42 μ ou 1345 cm^{-1} : bande des hydroxyles phénoliques
- 7,90 μ ou 1265 cm^{-1} : bande de liaison = C-O des éthers-oxydes et phénols
- 8,57 μ ou 1165 cm^{-1} : bande de la m-disubstitution

Chromatographie :

Par chromatographie sur papier et sur couche mince de polyamide on observe seulement une tache avec les valeurs de Rf suivantes :

Solvants	B A W	AcOH 15%	AcOH 60%	sur polyamide
Rf	0,70	0,11	0,51	0,18

La tache a une fluorescence jaune en U.V.

Aglycone de la substance B :

Par hydrolyse acide de 10 mg de substance, extraction par l'éther, évaporation de celui-ci et recristallisation de la substance dans l'acide acétique 20%, on obtient un précipité jaune présentant des spectres U.V. et I.R. superposables à ceux de la quercétine témoin.

L'aglycone de la substance B est donc de la quercétine.

Sucres :

Après hydrolyse, extraction de l'aglycone et neutralisation de la solution aqueuse, la chromatographie sur papier dans différents solvants révèle une seule tache. Les valeurs de Rf sont les mêmes que celles du rhamnose témoin.

Par différentes méthodes on peut déterminer le nombre de molécules de sucres dans la substance B :

- par hydrolyse acide de la substance B on obtient 59,2% d'aglycone (5,15mg d'aglycone à partir de 8,7mg de substance B).

- la chromatographie sur couche mince de polyamide de la substance B donne une tache jaune de Rf 0,18.

De ces résultats on peut penser que la substance B est une monorhamnosyl de la quercétine.

Position de l'hydroxyle phénolique combiné :

La substance B se compose donc d'une molécule de quercétine et d'une molécule de rhamnose. La position du rhamnose est déterminée par action des différents réactifs sur le spectre U.V.

<u>Réactifs</u>	<u>Bandes I et II</u>	<u>Déplacement</u>
Ethanol neutre	376nm et 259nm	
Chlorure d'aluminium	440nm et 270nm	bande I 64 nm
Acétate de sodium	385nm et 263nm	bande II 4nm
Borate de sodium	397nm et 263nm	bande I 21nm
Ethylate de sodium	450nm inf.instable	

Le chlorure d'aluminium provoque un déplacement bathochrome de 64nm sur la bande I. Les hydroxyles en 3 et 5 sont donc libres, ce qui confirme aussi la fluorescence jaune aux U.V. Le déplacement de la bande I de 21nm avec l'acétate de sodium et l'acide borique montre que les hydroxyles en 3' et 4' sont libres.

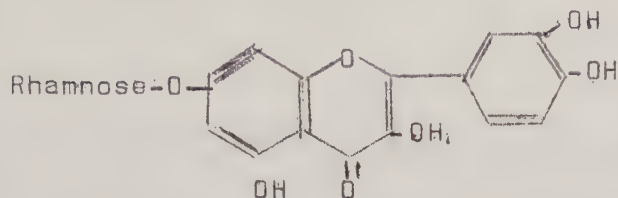
Par addition d'acétate de sodium on observe un léger effet bathochrome de 4nm seulement sur la bande II. L'hydroxyle en 7 est donc bloqué par le rhamnose.

Les résultats obtenus montrent que la substance B de Vincetoxicum officinale est la rhamnosyl-7 quercétine.

La concentration est de 1% environ.

La même substance avait été obtenue par hydrolyse enzymatique de vincetoxicoside A. Les deux substances ont en effet les mêmes spectres U.V. et I.R., le même point de fusion et les mêmes valeurs de Rf dans les différents solvants.

La formule chimique de la substance B est :



La substance B est donc la rhamnosyl-7 quercétine, également nouveau glycoside de la quercétine, présentant les caractéristiques suivantes ;

Point de fusion :

- sur banc chauffant : 270°C
- au microscope : 265 à 268°C

Spectre I.R. (voir figure VI).

Nous proposons pour ce produit nouveau le nom de :

vincétoxicoside B

Etude de la substance C.

L'éluat C est amené à 5cm³ par évaporation sous vide. Après addition de 5cm³ d'eau distillée, on laisse reposer vingt-quatre heures au réfrigérateur. La substance C ne précipite pas. La solution donne une réaction positive au test de la cyanidine. La substance C est donc un flavonoïde, mais sa concentration dans les feuilles de Vincetoxicum officinale est si faible qu'on ne peut l'isoler et déterminer sa structure.

Etude de la substance D.

L'éluat D est amené à 5cm³ par évaporation sous vide. Après addition de 5cm³ d'eau distillée, on laisse reposer vingt-quatre heures au réfrigérateur. Le précipité apparu est filtré, lavé rapidement à l'eau distillée et séché une demi-heure à l'étuve à 105°C. On obtient 26mg de substance D cristallisée.

C'est une poudre jaune constituée d'aiguilles fines sans odeur ni saveur. Elle donne une réaction positive au test de la cyanidine, caractéristique des flavones.

Le spectre U.V. est caractéristique d'un hétéroside en 3 de la quercétine :

<u>Réactifs</u>	<u>Bandes I et II</u>	<u>Déplacement</u>
Ethanol neutre	365nm et 259nm	
Chlorure d'aluminium	408nm et 271nm	bande I 43nm
Acétate de sodium	390nm et 273nm	bande II 14nm
Borate de sodium	377nm et 262nm	bande I 12nm

La chromatographie de la substance D donne dans les différents solvants les mêmes valeurs de Rf que celle de l'isoquercitrine témoin :

	B A W	AcOH 15%	AcOH 60%	couche mince de polyamide
Substance D	0,58	0,42	0,61	0,22
Isoquercitrine	0,56	0,41	0,64	0,21

Le spectre I.R. de la substance D est superposable à celui de l'isoquercitrine (glucosyl-3 quercétine) témoin.

Ceci nous permet de conclure que dans les feuilles de Vincetoxicum officinale Moench. se trouve de l'isoquercitrine = glucosyl-3 quercétine à la concentration d'environ 1%.

Etude de la substance E.

L'élut E est amené à 5cm³ par évaporation sous vide. Après addition de 5cm³ d'eau distillée on laisse reposer vingt-quatre heures au réfrigérateur. Le précipité apparu est filtré, lavé à l'eau distillée et séché une demi-heure à l'étuve à 105°C. On obtient 14mg de substance E cristallisée.

C'est une poudre jaune constituée d'aiguilles fines, sans odeur ni saveur. Elle donne une réaction positive au test de la cyanidine caractéristique des flavones.

Le spectre U.V. est caractéristique d'un hétéroside en 3 de la quercétine :

<u>Réactifs</u>	<u>Bandes I et II</u>	<u>Déplacement</u>
Ethanol neutre	360nm et 259nm	
Chlorure d'aluminium	410nm et 273nm	bande I 50nm
Acétate de sodium	385nm et 277nm	bande II 18nm
Borate de sodium	375nm et 264nm	bande I 15nm

La chromatographie de la substance E donne dans les différents solvants les taches de mêmes valeurs de R_f que celles de la quercitrine témoin :

	B A W	AcOH 60%	AcOH 15%	couche mince de polyamide
Substance E	0,69	0,66	0,52	0,20
Quercitrine	0,71	0,71	0,50	0,20

Ceci nous permet de penser que dans les feuilles de Vincetoxicum officinale se trouve de la quercitrine = rhamnosyl-3 quercétine à la concentration d'environ 1%.

Etude de la substance F.

L'éluat F est évaporé sous vide. Le résidu est dissous dans quelques cm³ d'acétate d'éthyle et additionné de 10cm³ de chloroforme. Après quarante-huit heures de repos au réfrigérateur un précipité est apparu. C'est une poudre blanche qui donne une vive coloration avec le chlorure ferrique mais ne réagit pas avec le magnésium chlorhydrique; ceci exclut une flavone mais non un polyphénol.

Le spectre U.V. présente les caractéristiques suivantes :

- deux maxima : à 245nm et à 332nm
- une inflexion à 305nm

Ce spectre U.V. est identique à celui de l'acide chlorogénique de référence (77), mais aussi à celui de l'acide caféique et à celui de l'acide férulique. En milieu alcalin le spectre U.V. se montre identique à celui de l'acide chlorogénique témoin :

les maxima d'absorption sont :

à 230nm, à 265nm et à 384nm

Le spectre I.R. est superposable à celui de l'acide chlorogénique témoin et montre les principales fréquences d'absorption suivantes :

- 2,95 ,u	ou	3380 cm^{-1}	=	hydroxyles libres
- 5,92 ,u	ou	1695 cm^{-1}	=	C = O d'ester
- 6,08 ,u	ou	1550 cm^{-1}	=	C = O carboxylique
- 6,60 ,u	ou	1515 cm^{-1}	=	phényles
- 6,95 ,u	ou	1440 cm^{-1}	=	phényles
- 7,77 ,u	ou	1285 cm^{-1}	=	la liaison = C-O des éthers oxydes et phénols.

Ceci nous permet de conclure que dans les feuilles de Vincetoxicum officinale se trouve de l'acide chlorogénique.

e) Hypothèses biogénétiques

De la présence (et de la teneur) des divers glycosides de quercétine précédemment isolés, on peut proposer que le vincétoxicoside A soit le terme final d'une double chaîne métabolique; la quercétine serait le produit de départ sur lequel agiraient simultanément une rhamnosidase (en 7) et une glucosidase (en 3). Le schéma ci-dessous résume cette proposition. On ne peut toutefois exclure totalement l'hypothèse selon laquelle le vincétoxicoside A serait un produit formé par d'autres voies biogénétiques à glycosidification précoce (stade $C_6 - C_3$ par exemple); les autres polyphénols ne seraient alors que des produits de dégradation voire même des artéfacts. Seule l'infection à la plante d'isoquercitrine marquée au ^{14}C permettrait par exemple de résoudre éventuellement le problème.

3) - Les substances stéroliques.

A. - Travaux antérieurs

Il y a déjà longtemps que les chercheurs effectuent des recherches chimiques sur les plantes de la famille des Asclépiadacées, car, elles ont été et sont encore utilisées en médecine populaire. De nos jours, beaucoup de travaux ont été exécutés sur cette famille, mais de nombreuses espèces ont une composition chimique imparfaitement connue. Les représentants de cette famille sont reconnus comme plantes vénéneuses, parce qu'elles contiennent des substances "nocives" mais elles ne sont pas si toxiques que les représentants de la famille voisine des Apocynacées. Les substances toxiques de ces plantes sont des glycosides et des alcaloïdes.

La plus connue des Asclépiadacées est Marsdenia condurango Rehb.fil. La plante est grimpante et pousse dans les Andes de l'Equateur, de la Colombie et du Pérou, de 1500 à 1800m d'altitude. On la cultive aussi en Afrique orientale. L'écorce sèche de Marsdenia condurango s'emploie comme médicament sous le nom de "Cortex condurango" et elle est inscrite au Codex dans tous les pays sauf en Grande-Bretagne, aux Etats-Unis, en Roumanie et au Portugal. De l'écorce on tire "l'Extractum condurango fluidum", le "Vinum condurango", le "Decoctum conduranginis", la "Mixture condurango" et la "Tinctura condurango" qui s'emploient en thérapeutique gastrique. Les Indigènes d'Amérique équatoriale l'ont employé contre les

morsures de serpent. On l'a introduit en Europe en 1871 et on l'a employé comme médicament contre les ulcères gastriques mais sans succès (78). Déjà Kübler (79) a constaté que l'écorce de la plante contient 1 à 2% de "condurangine" qui est un mélange de plusieurs glycosides amers dont on ne connaît pas la formule chimique. L'écorce contient également une résine toxique, un peu d'huile essentielle, des phlobaphènes, des phytostérols, etc

Des recherches ont été entreprises sur les glycosides amers car on a pensé qu'ils pouvaient avoir une action thérapeutique. On a établi leur formule structurale (80,81). Les résultats des recherches chez Marsdenia condurango ont amené les chercheurs à étudier les autres représentants de la grande famille des Asclépiadacées; on a constaté qu'ils peuvent être classés suivant leur constitution chimique en trois groupes :

- les plantes avec alcaloïdes;
- les plantes avec glycosides cardiotoniques
- les plantes avec glycosides esters du type C-nor D-homo pregnane.

Les alcaloïdes sont contenus surtout dans les espèces des genres Ceropegia (82) et Thylophora (83). Chez les genres Asclepias, Cynanchum, Dregea, Gomphocarpus et Marsdenia on a trouvé aussi des alcaloïdes mais ils ne sont pas les constituants majeurs. Willaman et Schubert (84) ont rassemblés les résultats des recherches sur les alcaloïdes

des Asclépiadacées, en remarquant qu'on les trouve également dans les genres suivants : Calotropis, Chlorostigma, Gemanthus, Gymnema, Heterostemma, Morrenia, Sarcolobus, Telosma et Vincetoxicum.

On trouve fréquemment des glycosides cardiotoniques chez les Asclépiadacées (85, 86, 87). Des réactions positives obtenues avec les réactifs de Kedde, Liebermann(88), Raymond (89) et Baljet (90) ont été observées dans les genres ; Xysmalobium (91,92), Gomphocarpus (93,94,95), Pachycarpus (96,97,98), Asclépias (99,100), Glossostelma (101), Perularia (102), Calotropis (103), et Menabea (104). A cela près on les a trouvés aussi chez : Parapodium, Schizoglossum, Aspidoglossum, Kanahia , Margaretta, Trachycalymna, Stathmostelma, et Gongronoma.

Le troisième groupe est constitué des espèces qui contiennent les glycosides stéroliques, ne donnant pas de réaction positive avec les réactifs spécifiques pour les glycosides cardiotoniques mais avec les réactifs spécifiques pour les stérols, comme le réactif de Liebermann, le chlorure d'antimoine et pour les 2-désoxysucres comme le xanthidrol. Grace aux spectres U.V. et I.R. on a constaté que la structure d'aglycone de ces glycosides doit être celle du C-nor D-homoprégnane. Ils ont un goût amer et on les retrouve exclusivement dans cette famille botanique. On les a trouvés pour la première fois dans les graines de Dregea volubilis (105) et par la suite

chez Marsdenia condurango (106,107), Asclepias glaucophylla (108), Cynanchum candatum (109), Gongronema taylori, Marsdenia erecta (110), et Cynanchum vincetoxicum (111 et 112); ultérieurement chez beaucoup d'espèces des genres Parapodium, Aranjia, Schisoglossum, Aspidoglossum, Pachycarpus, Asclepias, Pentarrhinum, Cynanchum, Sarcostemma, Oxypetalum, Amblyopetalum, Orthanthera, Dichaelia, Hoodia, Caralluma, Stapelia, Sphaerocodon, Gongronema, Ceropegia, Dregaa, Fochea, etc...

On ne peut pas faire une séparation rigoureuse des divers Asclépiadacées en trois groupes chimiques, car on trouve toujours des alcaloïdes accompagnant les glycosides stéroliques ou cardiotoniques, et c'est seulement la quantité de l'une ou l'autre de ces substances qui détermine la classification.

Dans les plantes du genre Vincetoxicum, on a trouvé des alcaloïdes (113,114,115,116,117) et des glycosides stéroliques (118,119,120,121). Parmi elles, c'est le Dompte-Venin, Vincetoxicum officinale Moench. qui a été le plus étudié. La plante contient beaucoup de substances telles que flavones, alcaloïdes, glycosides stéroliques, sucres, résines, acides phénoliques et huiles essentielles. On a pensé qu'elle agissait comme médicament par ses glycosides stéroliques (122) et pour cette raison de nombreuses recherches ont été faites sur ces derniers. Ils se trouvent surtout dans les racines. Zechner et ses collaborateurs (123) ont mis au point une méthode d'extraction. Ils ont constaté que le glycoside isolé (vincétoxine) est une

poudre jaune amorphe, mais qu'il ne s'agit pas d'une substance unique mais d'un mélange de deux glycosides voisins. Un moyen de séparation de ces deux glycosides est d'après l'Index de Merck (124) leur solubilités différentes dans l'eau. La formule brute proposée pour la vincétoxine (ou asclépiadine, asclépine et cynanchine) est d'après l'Index $C_{46} H_{70} O_{16} (OCH_3)_4$ ou $C_{50} H_{82} O_{20}$.

Korte et Ripphahn (80) ont étudié la structure de la vincétoxine en même temps que celle de la condurangine de Marsdenia condurango. Ils ont trouvé que la condurangine et la vincétoxine ont le même aglycone mais différent par les sucres. Après extraction et purification des glycosides, l'hydrolyse en milieu sulfurique a donné une masse amorphe de la vincétoxigénine. Ceci a été déshydraté par le sélénium et le produit obtenu a donné deux substances par chromatographie préparative avec les mêmes propriétés que les condurangogénines I et II. Les sucres obtenus par chromatographie étaient : D-glucose, D-thevetose, L-oleandrose et diginose.

B. - Travaux personnels.

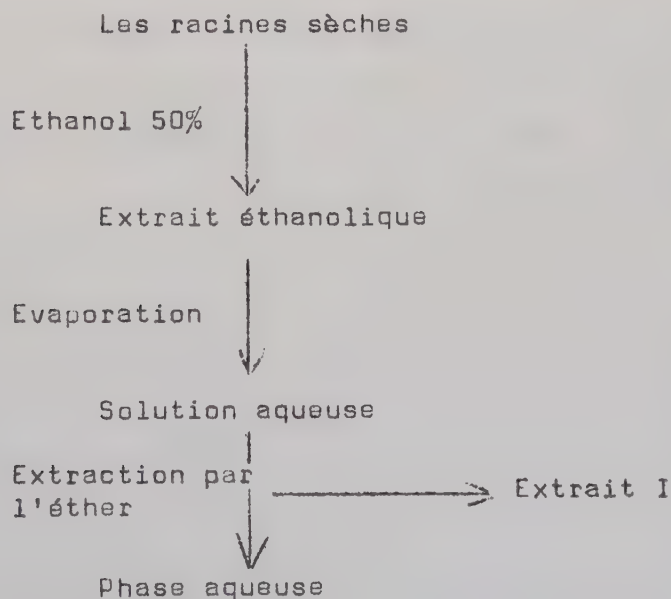
Dans ce travail nous avons voulu établir une méthode d'identification et de dosage de la vincétoxine chez Vincetoxicum officinale, afin de la doser dans différentes parties de la plante et à différents stades de la croissance de la plante.

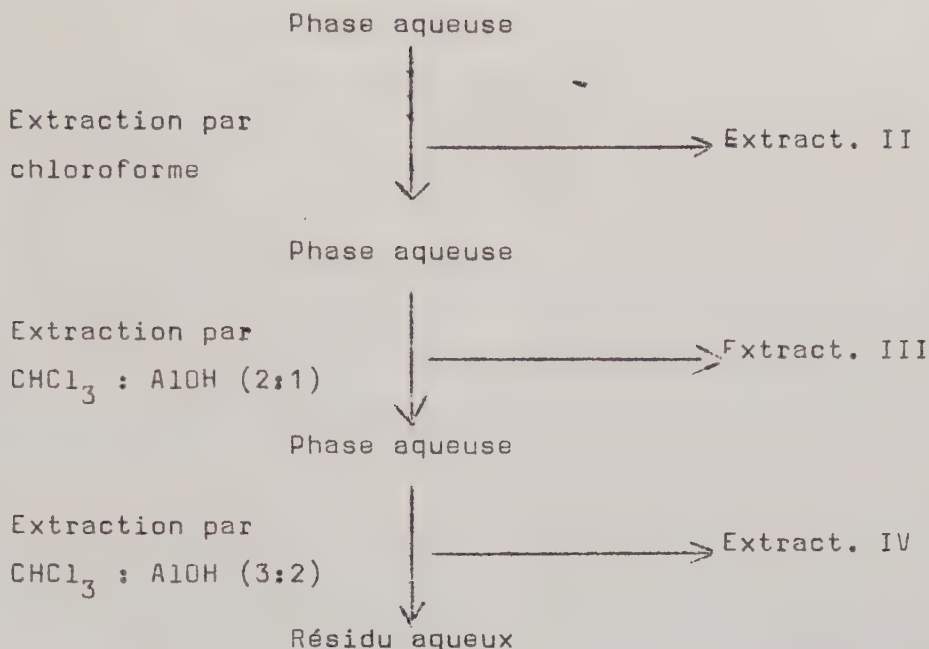
Pour cela nous avons fait :

- l'extraction de la vincétoxine
- des essais de sa purification
- des essais de détermination de sa structure
- une évaluation colorimétrique de la vincétoxine dans la plante.

a) Extraction

Après deux jours de macération dans l'eau, 1kg de poudre de racine est traité par l'éthanol 50% au percolateur. L'extraction (125) est finie quand l'extrait ne donne plus de réaction positive avec xanthidrol. On le concentre à 1000cm³ et on le purifie par addition d'hydroxyde de plomb (126). L'extrait purifié est agité trois fois avec 400cm³ d'éther, quatre fois avec 400cm³ de chloroforme, quatre fois avec 400cm³ de mélange chloroforme-éthanol 2:1 et quatre fois avec 400cm³ de mélange chloroforme-éthanol 3:2.





Tous ces extraits sont lavés à l'eau, puis avec une solution aqueuse de carbonate de sodium 2N et encore une fois à l'eau. Après élimination de l'eau par addition de sulfate de sodium anhydre, on évapore à sec les extraits.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau V :

Extraits	Quantité en g.	Teneur en %	Réactions KK, X, GZ, SbCl_3	Chromatographie sur couche mince, taches révélées par SbCl_3
I	0,862	0,09	+ + + +	A, B, C, D
II	1,667	0,17	+ + + +	A, B, C, E
III	0,394	0,04	+ + + +	A, B, D, F
IV	0,807	0,08	+ + + +	A, B, D, F
Total	3,730	0,38	+ + + +	A, B, C, D, E, F

KK = Keller Kiliani
X = Xanthidrol

GZ = Gager Zechner
 SbCl_3 = SbCl_3 dans chloroforme

On obtient quatre extraits qui donnent les mêmes réactions chimiques et des taches communes par chromatographie sur couche mince dans le solvant de Kaiser : chloroforme : tétrahydrofuranne : formamide=50:50:6,5. Toutes les taches donnent une réaction positive avec le chlorure d'antimoine, seule la tache A réagit avec le réactif de Gager-Zechner, spécifique de la vincétoxine. Tous les extraits sont amorphes et ne cristallisent pas dans les différents solvant utilisés. A partir de différents extraits on obtient 3,73 g. d'extrait de vincétoxine brute.

b) Purification

2,00g d'extrait brut sont dissous dans 20cm³ de benzène et chromatographiés sur colonne d'alumine neutre. On utilise successivement 300cm³ de différents solvants. La présence de la vincétoxine dans les différents éluats est décelée par le réactif de Gager-Zechner.

Fr.	Solvants	Eluat, poids en mg.	Test G.Zechner
1	Benzène	4	-
2	Benzène CHCl ₃ (1:1)	87	-
3	CHCl ₃	212	+
4	CHCl ₃ :MeOH (1:1)	848	+
5	MeOH	126	+
6	MeOH : eau (1:1)	72	-
7	eau	28	-
Total		1 377 (65%)	

TABEAU VI : Résultats de la purification d'extrait brut

La vincéttoxine se trouve dans les éluats 3,4 et 5. Par chromatographie, ces fractions ne révèlent qu'une seule tache de même Rf. La chromatographie sur couche mince donne deux taches très voisines, après révélation par le réactif de Gager-Zechner. Ceci permet de supposer que la vincéttoxine isolée n'est pas une substance pure, mais un mélange de deux substances homologues. On a essayé de les séparer par chromatographie préparative à l'aide de plus de trente solvants, mais sans aucun résultats positifs.

Les éluats 3,4 et 5 sont rassemblés, dissous dans quelques cm³ de chloroforme et additionnés d'éther de pétrole. Après deux jours de repos au réfrigérateur, il se forme un précipité jaunâtre. Nous avons obtenu 320mg de précipité. C'est une poudre blanche-jaunâtre, donnant une réaction positive aux tests de Gager-Zechner, de Pesetz, de Liebermann, de Salkowski et de Keller-Kiliani, mais elle ne réagit pas avec les réactifs de Legal et de Kedde. Le spectre U.V. est superposable à celui de la vincéttoxine, donné par Korte (80). Il montre une seule bande à 278nm. La chromatographie sur papier dans le n-butanol donne une tache allongée de Rf 0,80 environ. La vincéttoxine présente dans le même solvant une tache de Rf 0,76 d'après la littérature.

c) Essais de détermination de la structure

200mg des 320mg de vincéttoxine précédemment obtenue sont dissous dans 10cm³ de méthanol. On ajoute 20cm³

d'acide sulfurique 0,2N et on porte une heure au bain-marie bouillant sous reflux. On évapore le méthanol et on laisse refroidir. La solution aqueuse d'aglycone et de sucres est agitée quatre fois avec 25cm³ de chloroforme. L'extrait chloroformique contenant l'aglycone est séché sur sulfate de sodium et évaporé sous vide. On obtient 87mg d'aglycone brut, amorphe. Le spectre U.V. de l'aglycone est superposable à celui de la vincétoxine et montre une seule bande à 279nm. La chromatographie avec le butanol donne une tache révélée par la chlorure d'antimoine de Rf 0,50. La valeur de Rf donnée dans la littérature pour la vincétoxigénine est de 0,45 dans le même solvant. La tache se colore en rouge par le réactif de Gager-Zechner, mais la couleur disparaît rapidement.

La solution aqueuse est neutralisée par passage sur colonne de Permutite A, concentrée et chromatographiée. On observe dans le n-butanol-pyridine-eau = 3:1:3 quatre taches dont deux sont identifiées, en présence de sucres témoins, comme le glucose et le thevetose. Ces quatre taches ont des valeurs de Rf identiques aux quatre taches osidiques de la vincétoxine de Korte (80).

On peut penser que le glycoside isolé des racines de Vincetoxicum officinale est identique à la vincétoxine de référence. On ne connaît pas encore sa structure et nos travaux n'ont pas été orientés dans cette voie, d'autant plus que Korte et nous-mêmes possédons une substance amorphe et constituant vraisemblablement un mélange deux corps.

d) Evaluation colorimétrique de la vincétoxine

d-1) Méthode

Les 2-désoxysucres de la vincétoxine, tels que le L-oléandrose et le diginose, donnent une couleur rouge avec le xanthydrol; ceci permet de faire un dosage colorimétrique de la vincétoxine. La réaction est très sensible : elle est positive pour une concentration de 0,002% en 2-désoxysucre.

Réactif de Xanthydrol :

On mélange 97,5cm³ d'acide acétique, 1 cm³ d'acide chlorydrique concentré et 1,5cm³ d'une solution méthanolique à 10% de xanthydrol. Ce réactif, de couleur jaune, n'est pas stable.

Détermination d'une courbe témoin.

5mg de vincétoxine isolés des racines, purifiés par chromatographie et précipités dans l'éther de pétrole sont dissous dans 50cm³ de chloroforme. Dans une série de tubes on introduit des quantités croissantes (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5cm³) de cette solution, c'est-à-dire 0,050mg, 0,100mg, 0,150mg, 0,200mg et 0,250mg de vincétoxine. On évapore le chloroforme et on ajoute 10cm³ de réactif de xanthydrol. On laisse 15 minutes à la température ambiante, porte deux minutes au bain-marie bouillant puis cinq minutes à +4°C. On mesure à 530nm l'intensité de la coloration rose qui s'est développée (appareil spectrophotomètre Jobin Yvon).

Résultats :

Conc.	D. O.
0,050 mg	0,165
0,100 mg	0,325
0,150 mg	0,490
0,200 mg	0,650
0,250 mg	0,810

Dans ces limites, la courbe d'étalonnage est une droite, dont la pente permet de proposer la formule de dosage suivante :

$$D O \times \frac{d}{p} \times 3,07 \cdot 10^{-2} = \% \text{ de vincéttoxine}$$

où

DO = densité optique

d = dilution

p = poids de matériel végétal.

Dosage de la plante.

3gr de matériel végétal sec et pulvérisé, imbibés par 2cm³ d'eau sont laissés mécerer pendant vingt-quatre heures à la température ambiante dans 60cm³ d'acétate d'éthyle. On filtre, pipette 40cm³ d'acétate d'éthyle et on les laisse évaporer à l'air. Le résidu est purifié par passage sur colonne d'alumine neutre. On élue la vincéttoxine par 50cm³ mélange eau-méthanol (1:1). On évapore le méthanol et on agite la solution aqueuse

quatre fois avec 20cm³ de chloroforme. Les extraits chloroformiques rassemblés sont séchés sur 5g de sulfate de sodium anhydre, filtrés et dilués à 100cm³ par du chloroforme. 1,00cm³ de cette solution est évaporé et on ajoute 10cm³ de réactif de xanthidrol. La couleur apparaît après 15 minutes. On porte le tube deux minutes au bain-marie bouillant et cinq minutes à +4°C. Après cinq minutes on mesure l'intensité de la coloration à 530nm.

Il ne s'agit malgré tout que d'une évaluation assez arbitraire de la teneur en vincétoxine, car, on ne possède pas de vincétoxine étalon; elle permet cependant de comparer entre eux divers échantillons de plantes de manière homogène et reproductible.

d - 2) Résultats

L'évaluation colorimétrique de la vincétoxine est faite sur différents organes de dix échantillons de plantes récoltés le 2 juin 1966 sur les terrains calcaires près de Ljubljana.

Organes	% vincétoxine	% moyen
Racines	0,88 à 1,00	0,91
Tiges	0,21 à 0,25	0,23
Feuilles	0,21 à 0,25	0,23
Fleurs	0,24 à 0,27	0,25
Graines	0,27 à 0,30	0,28
Gousses	0,19 à 0,23	0,21

TABLEAU VII' : Evaluation colorimétrique sur la plante sèche.

Le tableau VII montre que la vincétoline est présente dans toute la plante. Les racines sont les plus riches (0,9% environ); dans les autres parties de la plante la concentration en vincétoline est quatre fois plus faible.

Le dosage de la vincétoline est fait aussi sur des tiges récoltées à différentes époques de la croissance :

Date de la récolte	% vincétoline
9 juin	0,22
13 juillet	0,15
5 août	0,14
10 septembre	0,09
10 octobre	0,05

La teneur en vincétoline semble donc diminuer avec l'âge de la plante, fait probalement dû, en partie, à l'augmentation de la lignification.

---ooo00ooo---

Troisième partie

La culture des tissus in vitro =====

A. - Travaux antérieurs

Les succès obtenus par les anatomistes et les physiologistes dans le domaine de la culture des tissus animaux sur milieux artificiels ont incité les botanistes à s'engager dans la même voie. Haberlandt (127) a été le premier à tenter cette recherche dès 1902, mais les résultats définitifs ont été acquis par Gautheret (128), White (129) et Nobécourt (130) qui ont réussi, indépendamment les uns des autres, la culture indéfinie de tissus végétaux sur milieu synthétique. Il restait à réaliser la culture in vitro de cellules; cela fut réalisé ces dernières années par des chercheurs anglosaxons et français.

La prolifération de ces massifs et les divisions cellulaires in vitro permettent d'envisager dans un avenir prochain, des réalisations biologiques importantes, intéressant le domaine de la morphologie ou de la biochimie.

- Les techniques de préparation

Pour obtenir une culture de tissus il convient de prélever l'échantillon végétal, de la stériliser, de disposer

d'un milieu nutritif approprié, de l'ensemencer, dans un local et à l'aide d'un matériel stéril puis, de laisser la croissance se développer dans des salles climatisées et éclairées dans des conditions déterminées.

On peut partir d'organes de plantes : racines, tiges, graines, pollen ou de tumeurs de plantes préalablement inoculées par Agrobacterium tumefaciens. Les prélèvements sont stérilisés en surface par un lavage rapide à l'alcool, puis par un trempage dans des solutions d'hypochlorite de sodium (30%) ou de chlorure mercurique (2%) pendant un temps variable.

La composition du milieu nutritif est très complexe et mérite un paragraphe spécial. Il doit être rigoureusement adapté à chaque culture. Il est soit liquide soit le plus souvent solide.

L'ensemencement se fait dans un local dépoussiéré et stérilisé par des lampes U.V. germicides. Le matériel est stérilisé classiquement à l'autoclave ou par flambage à l'alcool. Les récipients servant à la culture sont soit des boîtes de Petri, soit des tubes à essais de fort diamètre, soit des erlenmeyers, soit des ballons de 150 à 250cm³ ou même 1000 à 5000 cm³.

Après ensemencement, la croissance de ces cultures se fait dans des chambres spéciales à la température de 20 à 23°C, à l'obscurité ou sous des lumières artificielles de différentes longueurs d'ondes. On peut aussi les conserver à la lumière du jour. Après un temps de l'ordre de 2 à 3 mois,

les cultures ont épuisé le milieu et doivent être transplantées sur un milieu frais, c'est-à-dire repiquées.

- Les milieux.

Tous les chercheurs pratiquant les cultures de tissus végétaux apportent la plus grande attention à la composition du milieu. On emploie surtout ceux de Heller (131), Murashige et Skoog (132), White (133) et Knop au $\frac{1}{2}$ (134). Ils se composent d'eau, de sels minéraux, de source de carbone et de facteurs de croissance : auxines, vitamines, amino-acides, extrait de levure, lait de Coco et hydrolysate de caséine (135). Le milieu est solidifié par de la gélose ou du silicagel. L'eau utilisé pour la préparation du milieu doit être distillée ou bidistillée.

Les éléments nécessaires au développement des cultures se divisent en deux groupes :

- le groupe des éléments en macroconcentration de 30 à 400mg par litre de milieu;
- le groupe des éléments en microconcentration de 0,01 à 0,5 mg par litre de milieu.

Le groupe des macroéléments comprend : N, S, P, K, Mg et Ca. On les met dans le milieu sous forme de sels de sodium et de chlorures.

Le groupe des microéléments renferme : B, Cu, I, Fe, Mn, Mo et Zn en très faible concentration.

Le carbone est apporté sous forme de sucres. Les meilleurs sont le saccharose et le glucose (136,137). On les ajoute au milieu à la concentration de 3 à 5%.

- Les auxines.

Les auxines stimulent la prolifération des cellules. On emploie l'acide β -indole-acétique (ABIA), hormone naturelle, et d'autres produits synthétiques : l'acide α -naphthalène acétique (ANA), l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Les concentrations maximales sont : 5-10mg/l pour l'ABIA, 10mg/l pour l'ANA et 6mg/l pour le 2,4D (138).

- Les vitamines.

Il est nécessaire d'apporter aux milieux des vitamines, car les cultures des tissus, à l'inverse de la plante, ne les synthétisent pas. Elles sont introduites soit indirectement par l'extrait de levure, le lait de Coco et l'hydrolysate de caseine, soit directement, en quantité très variable n'excédant pas toutefois 10^{-4} g/l. C'est surtout le cas des vitamines du groupe B : thiamine, acide pantothénique, biotine, méso-inositol, pyridoxine, acide nicotinique et acide ascorbique. Risser et White (139) estiment que la présence de thiamine, d'inositol, d'acide nicotinique et d'acide ascorbique est nécessaire pour la croissance des tissus tumoraux de racines.

- Les amino-acides.

L'azote sous forme d'ammonium, de nitrates et nitrites ne représente pas tout l'azote nécessaire aux cellules des tissus végétaux. On doit l'ajouter aussi sous forme d'amino-acides (140). Les plus utilisés sont le. glycocolle, la glutamine et l'asparagine. Leur concentration est de 10^{-9} à 10^{-3} g/l.

Heller		Murashige-Skoog		Knop au $\frac{1}{2}$	
KCl	750mg/l	KNO ₃	1900mg/l	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	500mg/l
NaNO ₃	600	NH ₄ NO ₃	1440	KNO ₃	125
MgSO ₄	250	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	MgSO ₄ ·7H ₂ O	125
NaHPO ₄	120	CaCl ₂	332	KH ₂ PO ₄	125
CaCl ₂	70	KH ₂ PO ₄	136	glucose	30g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1mg/l	MnSO ₄ ·H ₂ O	14		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,1		
H ₃ BO ₃	1	H ₃ BO ₃	4,8		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03	K I	0,8		
AlCl ₃	0,03	(NH ₄) ₆ MoO ₂ ·4H ₂ O	0,18		
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,03	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02		
K I	0,01	Glucose	2%		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,1	EDTA (sel 80mg /1Na)			
		Lait de Coco	15%		
		Gélose	6%		
		Nicotinamide	1mg/l		
		Ac.pantothénique	1mg/l		
		Pyridoxine	1		
		Thiamine	1		
		Riboflavine	0,1		

TABLEAU VIII : Milieux de culture

B. - Travaux Personnels

a) Préparation de la culture

Tous les essais de culture de tissus végétaux de Vincetoxicum officinale ont été réalisés au Laboratoire de Botanique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de LYON, sous la conduite de Monsieur le Professeur G. NETIEN. Ces travaux débutèrent en 1963.

Des tiges fraîches, cueillies au jardin botanique le 14 juin 1963, sont stérilisées par la méthode habituelle (passage dans l'éthanol et l'hypochlorite de sodium durant quelques minutes). On place alors dans les tubes de cultures des sections de tiges, prises au niveau des noeuds, de 2cm environ de longueur, en inversant la polarité. Le milieu est constitué par les solutions minérales de Heller auxquelles on ajoute 0,1% d'extrait de malt, 0,1% d'extrait de levure, 50mg/l d'EDTA (sel de Na), du glucose à la concentration de 2% et 0,7% de gélose. Ce milieu est repartie en fraction de 20cm³ dans des tubes à essais en pyrex, de 20cm de hauteur et 2,5cm de diamètre. Il est stérilisé à l'autoclave dans les conditions habituelles.

Des essais complémentaires ont été réalisés avec le milieu de Murashige et Skoog et celui de Knops au $\frac{1}{2}$, mais les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec le milieu de Heller dans lequel était ajouté le 2,4-D (141).

La salle de culture qui a servi à nos expériences est conditionnée à 23°[±]1°C, éclairée par des lampes Phytol L.F.

40W, lumière du jour, avec éclairage intermittent de 8h.
L'intensité lumineuse était de 1200 Lux au niveau des cultures.

Au bout de quelques jours apparaissent à la partie supérieure des tiges ensemencées, des proliférations blanchâtres, constituées par des amas de cellules parenchymateuses irrégulières, spécialement développées dans les milieux contenant du 2,4-D. Il semble que cette auxine soit indispensable à la réalisation des cals primaires de Vincetoxicum officinale.

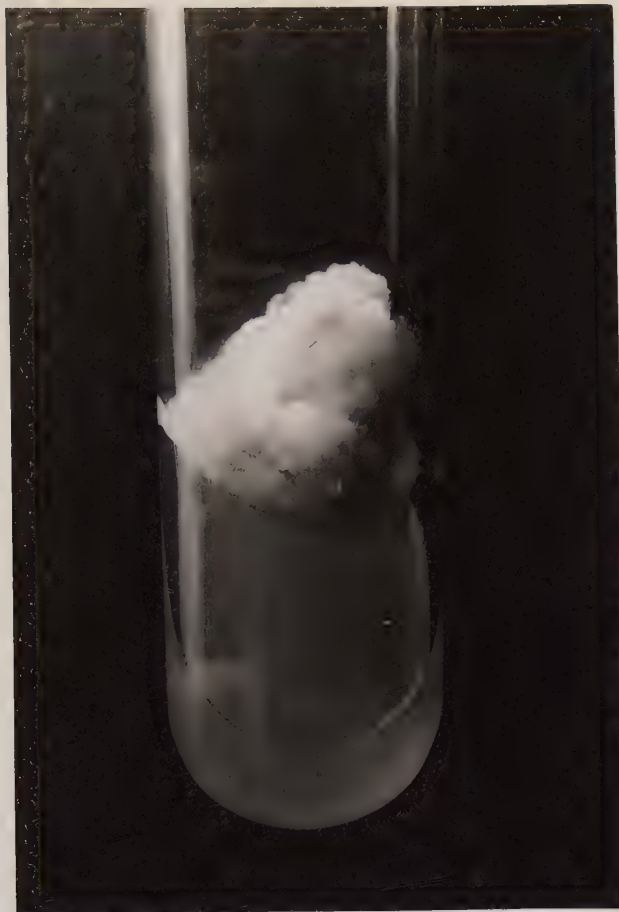
Après trois mois de cultures, nous avons obtenu un cal suffisamment développé pour être repiqué sur milieu neuf. Pour le premier repiquage, le milieu a été légèrement modifié en augmentant la dose de 2,4-D à 6mg/l, puis en l'abaissant à 3mg/l pour le deuxième repiquage. C'est ce dernier milieu qui a servi aux nombreux repiquages de cette culture qui est actuellement âgée de 42 mois et a subi 15 repiquages. Nous pouvons considérer cette culture comme définitivement stabilisée.

La culture se présente sous la forme d'une masse verdâtre, mamelonnée, sans différenciation. Sa surface est parsemée de quelques îlots blanchâtres. La culture prend cet aspect dans les conditions de lumière fluorescente et discontinue de la salle de culture du laboratoire; exposée à la lumière du jour, elle prend une teinte un peu plus verdâtre. Dans le cas où la culture épuise totalement ses réserves, on observe localement des masses plus sèches et colorées en brun.

Après deux mois de croissance une culture décuple environ son poids initial.

Une coupe réalisée après inclusion dans la paraffine, effectuée au microtome de Minot et colorée au Brun de Bismarck, montre dans sa phase de croissance optimale les éléments suivants :

- un tissu homogène de cellules polygonales, méristématiques et indifférenciées;
- des nodules constitués par des vaisseaux laticifères;
- quelques rares formations cribro-vasculaires.



Aspect de culture de tissu de Vincetoxicum officinale



Coupe de culture de tissu de Vincetoxicum officinale

b) Etude chimique.

Ces dernières années, plusieurs biochimistes ont orienté leurs recherches sur la nature chimique des cultures in vitro, pour expliquer les mécanismes de biosynthèse dans les plantes. Déjà quelques résultats ont été obtenus par Chan et Staba (142) pour la synthèse de la hyoscine dans les cultures de racine de Datura stramonium où la proportion est plus importante que dans la plante; par Scotte (143) pour les acides organiques; par Kordan (144) pour la synthèse des flavonoïdes; enfin la synthèse des glycosides cardiotoniques a été étudiée par Staba et Coll. (145,146).

Nous avons essayé dans ce travail de rechercher et doser dans les cultures de tissus in vitro les substances analysées dans la plante. Les essais préliminaires effectués en 1966 nous fournissent une première orientation (147); plus récemment, nous avons fait l'analyse de 200g de cultures. Les résultats sont donnés aux tableaux IX, X et XI.

Test	Cal	Tige
Teneur en eau	92,9 %	80 %
Cendres	0,57 %	4,8 %
Flavones	0,00 %	0,03 %
Glycosides stéroliques	0,01 %	0,21 %
Azote total	2,1 %	1,6 %
Protéines (N x 6,25)	13,1 %	10,0 %
Ext. éthéro-pétrolique	5,8 %	5,7 %
Ext. chloroformique	0,8 %	3,1 %
Ext. alcoolique	23,4 %	23,2 %

TABEAU IX : Résultats des analyses préliminaires

C a l		T i g e	
Valeur de Rf	Fluores. en U.V	Valeur de Rf	Fluores. en U.V
-	-	0,52	jaune
0,75-0,85	bleu	0,75-0,85	bleu
0,90	jaune-brun	0,90	jaune-brun

TABEAU X : Chromatographie des extraits chloroformiques dans le BAW

C a l		T i g e	
Valeur de Rf	Fluores. en U.V	Valeur de Rf	Fluores. en U.V
0,40	bleu	0,40	bleu
-	-	0,43	brun
-	-	0,54	jaune
-	-	0,60	bleu
0,80	bleu	0,86	bleu
0,90	jaune-brun	0,90	jaune-brun

TABEAU XI : Chromatographie des extraits alcooliques dans le BAW

On retrouve en commun dans les extraits de cals et de tiges les taches des acides (taches bleues) et des glycosides stéroliques (taches jaune-brun).

Les acides phénoliques

3g de cals séchés sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2N, 40 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, la solution acide est agitée avec de l'éther. L'extrait obtenu ne réagit pas au test de la cyanidine, mais il donne avec le chlorure ferrique une coloration jaune-verdâtre, ce qui montre la présence de substances polyphénoliques. La chromatographie dans le solvant de Forestal donne deux taches bleues en U.V de Rf 0,70 et 0,82 et une tache jaune-brun en lumière visible de Rf 0,94.

La tache jaune-brun réagit au test de Gager-Zechner (vincétoxigénine).

Les taches bleues réagissent avec le chlorure ferrique; elles correspondent à des polyphénols. Leurs spectres U.V ont deux maxima :

à 245nm et à 330nm

qui sont caractéristiques soit de l'acide chlorogénique, de l'acide férulique ou de l'acide caféique. Pour les identifier nous avons fait migrer ces trois acides témoins dans deux solvants différents.

Les taches sont révélées :

- par U.V avant la pulvérisation
- en lumière du jour par pulvérisation de p-nitroaniline diazotée et d'une solution de carbonate de sodium (148).

Substances	. Rf		Fluorescence	Pulverisation
	Sol 1	Sol 2	U.V-NH ₃	
Tache A	0,71	0,20	bleu-vert	orangé
Tache B	0,82	0,56	bleu	violet
Ac.caféique témoin	0,71	0,22	bleu-vert	orangé
Ac.férulique témoin	0,82	0,57	bleu	violet
Ac.chlorogénique témoin	0,64	0,86	bleu	violet

TABLEAU XII : Chromatographie des acides polyphénoliques

Sol.1 : Forestal : acide acétique-acide chlorhydrique-eau = 30:3:10
(Papier Whatman n° 1)

Sol.2 : Isopropanol-amoniaque conc.-eau = 8:1:1
(Papier Schleicher-Schüll n° 2043b)

De ces résultats on peut déduire la présence de
l'acide caféique et l'acide férulique dans la culture in vitro
de Vincetoxicum officinale

Les amino-acides

Une recherche qualitative des acides aminés a été faite sur la tige de Vincetoxicum officinale et sur les cals.

Les tissus de tige ou de cals desséchés ont été traités par l'alcool éthylique à 50°. L'extrait hydroalcoolique correspondant à 5g de prise d'essai (poids sec) est filtré et passé lentement sur résine cationique-C 500 (Permutite) régénérée par HCl N/1 et convenablement lavé à l'eau distillée.

La colonne est éluée par NH_4OH N/1 et l'éluat ammoniacal est évaporé sous vide jusqu'à résidu sec. Le résidu est solubilisé dans l'alcool à 50° (5ml), la solution est filtrée et soumise à une chromatographie descendante, bidimensionnelle, sur papier Arches 302.

Les solvants utilisés dans l'ordre sont :

1/ Butanol - acide formique - eau (75-15-10)

2/ Phénol - eau (80-20)

Les durées de migration des solvants sont de l'ordre de 12 heures pour le premier et de 15 à 18 heures pour le second, le développement se faisant à une température de 20°C.

Après séchage complet du dernier solvant, le chromatogramme est immergé dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2% légèrement acidifiée par l'acide acétique (0,1%).

La révélation peut être accélérée par passage du chromatogramme à une température de 60-70°C; toutefois, il est préférable de suivre la révélation à température du laboratoire, révélation lente qu'il convient d'examiner au bout de 24h. Dans ces conditions, les colorations caractéristiques de certains amino-acides gardent toute leur nuance pour faciliter l'identification de ceux-ci :

spots jaune pour la proline, jaune-orangé pour l'hydroxyproline, brun-orangé pour l'asparagine, bleu-turquoise pour la phénylalanine, gris pour la lysine, les autres amino-acides présentant des taches bleu-violacé.

Résultats.

Il n'a pas été fait d'analyse quantitative. L'analyse qualitative, cependant, par comparaison des taches, permet d'apprécier les différences de composition en acides aminés des tiges et des cals de Vincetoxicum officinale. Pour cela, des quantités identiques de solution hydro-alcoolique d'acides aminés ont été déposés sur le chromatogramme, les solutions ayant été préparées de telle sorte que la quantité d'alcool à 50° était en volume égale au poids de matériel sec de la prise d'essai (5ml pour 5g.).

Les acides aminés déterminés sont les suivants :

- Glycocolle, α et β alanine, valine, leucine et isoleucine;
- Acide aspartique, acide glutamique, acide γ aminobutyrique;

- Asparagine et glutamine;
- Sérine et thréonine;
- Méthionine;
- Histidine, ornithine, lysine et arginine;
- Phényl alanine
- Proline et hydroxyproline.

Quatre spots n'ont pu être identifiés et semblent correspondre à de petites peptides; l'un d'eux, toutefois, semble être du glutathion mais nous n'avons pu le préciser avec certitude.

On retrouve qualitativement la même composition en acides aminés dans les tiges et les cals installés de Vincetoxicum officinale. La différence est purement quantitative; la comparaison de chromatographies sur lesquelles ont été déposées des quantités variables (10 μ pour la tige, 20 μ pour les cals) permet de dire que les tissus cultivés renferment trois ou quatre fois moins d'acides aminés que les tiges.

A côté des amino-acides rencontrés constamment dans les tissus végétaux (acides dicarboxyliques et leurs amides, amino-acides à fonction alcool, amino-acides simples), il faut souligner la quantité très importante de proline, celle des acides aminés basiques : lysine, histidine, arginine et ornithine ainsi que la présence de phénylalanine. Certains de ces amino-acides sont susceptibles de présenter un intérêt si l'on considère qu'ils peuvent être des précurseurs dans

la génèse des alcalo ides de Vincetoxicum officinale dont la Tylophorine en représente le type. HAZNAGY a imaginé une biogénèse dans laquelle les métabolites essentielles seraient la dihydroxyphénylalanine, l'ornithine, la tyrosine et l'aldéhyde γ -aminobutyrique.

Si nous trouvons de la phénylalanine, de l'ornithine et de l'acide γ aminobutyrique, par contre nous n'avons pas pu mettre en évidence de tyrosine.

Une autre voie dans la biogénèse de la Tylophorine pourrait être envisagée à partir de la proline qui semble être, en quantité, l'acide aminé le plus remarquable de la tige ou de la culture de tissus de Vincetoxicum. Nous pensons que l'analyse quantitative des alcalo ides et des acides aminés réalisée au cours du développement de la plante ou des tissus cultivés "in vitro" serait susceptible d'apporter des éléments nouveaux sur la biogénèse des alcalo ides de cette espèce.

Conclusions

Par rapport à la plante, la culture de tissus in vitro est plus hydratée et son faible résidu de cendres prouve sa pauvreté en sels minéraux. La présence d'acides phénoliques, d'acides aminés et de glycosides stéroliques montre que la biosynthèse de ces composés n'est pas modifiée par la culture de tissus in vitro. Par contre, on n'a pu mettre en évidence de dérivés flavoniques; dans les tiges, toutefois, ces substances existent à une concentration de 0,03% seulement et il est possible que dans les cals leur teneur soit si faible qu'on ne puisse les caractériser.

CONCLUSIONS GENERALES

=====

Ce travail a été consacré à l'étude d'une plante de la famille des Asclépiadacées, Vincetoxicum officinale Moench.

Dans la première partie, ayant trait à la Botanique, nous avons passé en revue tous les caractères du genre Vincetoxicum qui comporte environ 70 espèces, dont la répartition géographique s'étend à l'Asie tempérée, à l'Amérique du Sud et à l'Europe. Vincetoxicum officinale est originaire d'Europe; cette plante vivace, chez laquelle ont été distinguées plusieurs variétés, existe à l'état spontané dans toutes les régions montagneuses sur terrains calcaires ensoleillés et fait partie de l'association du Chrysanthemum corymbosum.

La deuxième partie est relative au chimisme de la plante. Au cours d'essais préliminaires, nous avons mis en évidence dans les feuilles et dans les tiges des dérivés flavoniques en quantités assez importantes. Il existe aussi dans ces organes, ainsi que dans les racines, une forte teneur en substances stéroïdiques donnant une réaction positive au test des 2-désoxysucres.

A partir des feuilles ont été isolés les sept composés polyphénoliques suivantes :

1. β -glucosyl-3 rhamnosyl-7 quercétine, structure naturelle nouvelle pour laquelle est proposé le nom de Vincetoxicoside.A. La teneur de ce constituant majeur atteint 2% du poids sec.

2. Rhamnosyl-7 quercétine, structure naturelle également nouvelle pour laquelle est proposé le nom de Vincetoxicoside B. (teneur : 1‰ environ du poids sec).

3. Glucosyl-3 quercétine ou isoquercitrine (teneur : 1‰ environ du poids sec).

4. Rhamnosyl-3 quercétine ou quercitrine (teneur : 1‰ environ du poids sec).

5. Quercétine libre : traces

6. Kempférol libre : traces

7. Acide chlorogénique.

La structure des vincetoxicosides A et B a été établie par méthodes chimiques (hydrolyses acide et enzymatique, méthylation) et physiques (spectre U.V., J.R., de R.M.N., de diffraction X); les autres substances ont été identifiées par chromatographies et spectrophotométrie U.V. et I.R.

A partir des racines a été caractérisé un glycoside stérolique donnant une réaction positive avec les réactifs généraux des stérols (Liebermann-Burchard, Salkowski, Trichlorure d'antimoine), avec les réactifs spécifiques des 2-désoxy-sucres (Keller-Kiliani, Pesetz) et avec le réactif de Gager-Zechner, spécifique de la vincétoxine; il donne une réponse négative aux tests de Kedde, de Raymond et de Baljet (spécifiques des glycosides cardiotoniques). D'après ses propriétés chromatographiques et spectrales, ce glycoside se montre identique à la vindétoxine, isolée de Vincetoxicum officinale par KORTE.

La vincétoxine, présente dans toute la plante, se signale par une forte teneur dans les racines (0,9% environ); dans les autres parties la concentration en vincétoxine est quatre fois plus faible.

Dans la troisième partie, nous avons donné les techniques de culture de tissus végétaux in vitro et une comparaison chimique entre ces derniers et la plante elle-même.

La culture de tissus effectuée en lumière artificielle sur milieu de Heller contenant 3mg/l de 2,4-D se présente sous la forme d'une masse verdâtre, mamelonnée, sans différenciation. Sa surface est parsemée de quelques îlots blanchâtres. Après deux mois de croissance la culture décuple environ son poids initial.

Par rapport à la plante, la culture de tissus in vitro est plus hydratée et son faible résidu de cendres souligne sa pauvreté en sels minéraux. La présence d'acides phénoliques, d'acides aminés et de glycoside stérolique montre que la biosynthèse n'est pas modifiée pour ces composés par la culture de tissus, mais les composés flavoniques, par contre, ont totalement disparu.

C O N C L U S I O N S
=====

- I. - Nous avons présenté un tableau d'ensemble des différentes espèces appartenant au genre Vincetoxicum, et étudié plus spécialement la répartition géographique des espèces de la flore européenne. Une étude détaillée morphologique intéresse particulièrement V. officinale L.
- II.- Après une étude générale des différents constituants de Vincetoxicum officinale, nos efforts ont porté sur les dérivés flavoniques ou stéroliques dont l'étude, pour les premiers, était peu développée. A partir des feuilles ont été isolés deux composés polyphénoliques suivants :
- β glucosyl-3-rhamnosyl-7 quercétine, structure nouvelle pour laquelle est proposé le nom de vincetoxicoside A. La teneur est d'environ 2%.
 - Rhamnosyl-7-quercétine, structure également nouvelle pour laquelle est proposé le nom de vincetoxicoside B. Teneur environ 1 5/100.
- III.- Les glycosides stéroliques des racines sont révélés appartenant comme structure aglyconique au C-nor-D homopregnane lié à des 2-désoxy sucres (Vincetoxines). Les variations ont été étudiées par une méthode colorimétrique que nous avons mise au point dans les différentes parties de la plante et au cours de son cycle annuel.

IV. - Une étude comparative réalisée sur la tige en culture in vitro a montré de profondes différences dans la composition.

Nous avons pu noter l'absence de substances flavoniques, un pourcentage de glucosides stéroliques inférieur à 10%, par contre une richesse plus grande en substances azotées et en acides phénoliques.

Le Président de la thèse :

G. NETIEN

VU et permis d'imprimer

LYON, le 25 avril 1967

VU, le Doyen,

J.F. CIER

Pour le Recteur, Président
du Conseil de l'Université :

J. BRACONNIER

B I B L I O G R A P H I E

=====

1. Bullock A.A. : Notes on African Asclepiadaceae, Kew Billet 1952(1957)
2. Abisch E., T.Reichstein : Helv.Chim.Acta 45, 2090 (1962)
3. Planchon L., P.Bretin, P. Manceau : Précis de matière médicale, A.Maloine, Paris (1906) II, 1182
4. Garnier G : Ressources médicinales de la Flore française, Vigot Frères, Paris (1961) 1013
5. Hegi G. : Illustrierte Flora von Mittel Europa, C.Hanser, München, (1958) V,3, 2058
6. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis E, II, 910
7. Piskernik A. : Ključ za dolociranje cvetnic, Ljubljana (1951) 210
8. Tucakov J. : Farmakognozija, Nauchaknjiga, Beograd (1948) 372
9. Chadeaud M., L.Emberger : Traité de botanique, Masson et Cie (1960) 766
10. Thoms H. : Handbuch der pharmazie, V, 1, 11481 (1937)
11. Tschirch A. : Handbuch der Pharmakognosie, Tauchnet, Leipzig (1908) 1542
12. Abisch E., T.Reichstein : Helv.Chim.Acta 43, 1844 (1960)
13. Engler A., K.Prantl : Die natürlichen Pflanzenfamilien, Borntraeger, Berlin (1954) IV, 2, 189
14. Nicholson G. : Dictionnaire pratique d'horticulture, Librairie agricole, Paris (1898-99) V, 501
15. Index Kewensis IV, 1204 (1845)
16. idem suppl. I, 454 (1906)
17. idem suppl. II, 193 (1904)
18. idem suppl. III, 188, (1908)
19. idem suppl. IV, 247, (1913)
20. idem suppl. V, 272 (1921)
21. idem suppl. VI, 218 (1926)
22. idem suppl. VII, 251 (1929)
23. idem suppl. VIII, 248, (1933)
24. idem suppl. IX, 296, (1938)
25. idem suppl. X, 243, (1947)
26. idem suppl. XI, 264, (1953)
27. idem suppl. XII, 150, (1958)

- Rouy G. : Flore de France, Deyrolle, Paris (1908) X, 230
29. Bonnier G. : Flore complète de France, Suisse et Belgique,
E. Orlhac; Paris (1934) VII, 105
30. Irmisch Thilo : Flora province Brandenburg (1859)
31. Chassagne M. : Flore d'Auvergne, P. Lechevalier, Paris (1957) II, 360
32. Ellenberg H. : Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen, E. Ulmer
(1963) 85
33. Ellenberg H. idem 98
34. Ellenberg H. idem 693
35. Shibata K., I. Nagai, M. Kishida : J. Biol. chem. 28, 93, (1916)
36. Baljet M. : Schweiz. Apoth. Ztg. 56, 71, (1918)
37. Burchard : Chem. Zhl. 1, 25 (1890)
38. Pesetz M., A. Petit, P. Bellet, G. Armird : Bull. Soc. chim. Fr. 17,
288 (1950)
39. Paech K., M.V. Tracey : Moderne Methoden der Pflanzenanalyse,
Springer Verlag. Berlin (1955) III, 152
40. Gerlach H. : Pharmazie 19, 741 (1964)
41. Pharmacopea Jugoslavica secunda (1953), 771
42. Stahl E. : Arch. Pharm. 292, 441 (1959)
43. Stahl E. : Chem. Ztg., 82, 323, (1958)
44. Randerath K. : Dünschicht chromatographie, Verlaag Chemie. (1962) 22t
45. Stahl. E. : Dünschicht chromatographie, E. Merck, A.G. Darmstadt
(1962)
46. Brenner M., A. Niederwieser : Experientia 16, 378 (1960)
47. Kedde D.L. : Diss Leyden (1946)
48. Kedde D.L. : Pharm. Weekblad 82, 741 (1947)
49. Zechner L., J. Kellenmayr : Sci. Pharm. 21, 81 (1953)
50. Macek K. : Handbuch der Papier chromatographie, Veb, Gustav
Fischer Verlaq (1960) 758
51. François M., L. Sequin : J. Pharm. Chim. 2, 59 (1925)
52. Bate-Smith E.C. : J. Linn. Soc. London (Bot.) 58, 154 (1962)
53. Geissmann T.A. : The chemistry of flavonoïd compounds, Pergamon
Press (1962)
54. Lebreton Ph., J. Chopin : Spectrochimica Acta V, 19, 2099 (1963)
55. Jurd L. : in Geissmann T.A. The chemistry of flavonoïd compounds,
Pergamon Press (1962) 119
56. Jurd L. : in Geissmann T.A. : idem 122
57. Jurd L. : in Geissmann T.A. : idem 127
58. Jurd L. : in Geissmann T.A. : idem 126
59. Lebreton Ph., M. Jay, B. Voirin : Chim Anal. Fr., Sous presse
60. Lebreton Ph. : Thèse Ing. Doct. Lyon (1960)
61. Ribeau-Gayon P., M.L. Josien : Bull. Soc. chim 934 (1960)
62. Nétien G., Ph. Lebreton : Ann. Pharm. fr., 22, 69, (1964)
63. Cronenberger L. : C.R. Acad.Sci. 249, 2423 (1959)

64. Etablissements Woelm, Eschwege
65. Neu R. : Nature 182, 660 (1958)
66. Randerath K. : Chromatographie sur couches minces, Gauthier-Villars, Paris (1964) 42
67. Block J.R. et coll. : Amanual of Paper chromatography, Academic Press, New-York (1958) 181
68. Lebreton Ph. : Thèse Doct. Univers. Lyon (1957)
69. Pou G., A.M. Staub : Bull.Soc.chim. biol. 1283 (1955)
70. Egger E. : Z. annalyt. chem. 182, 161 (1961)
71. Bodalski T., H. Bzadkowska-Bodalaka : Diss.Pharm.Pol. 18,3,285(1966)
72. Harborne J.B. : Phytochem. 4, 107 (1965)
73. Farmacopea Romana, VIII a (1965) 826
74. Harborne J.B. : Biochemistry of phenolic compounds, Academic Press (1964) 136
75. Mabry T.J., Kagan J., H. Rösler : Nuclear magnetic resonance analysis of flavonoïds, The University of Texas publication, Austin (1964) N° 6418
76. Robin J., Ph.Lebreton, Ch.Beau : Ext.J.Chim.phys. 779 (1962)
77. Sechet J., J. Masquelier, F.Tayeau : Bull.Soc.Chim. biol. 41, 1063 (1959)
78. Perrot E. : Matières premières, Masson (1944) Règne végétal II, 1798
79. Kübler K. : Archiv der Pharmagnosie CCXLVI (1903)
80. Korte F., J. Ripphahn : Ann.Chem. 58, 621 (1959)
81. Korte F., H. Barkenmeyer, J.Korte : Fortschr.Chem.Org.Naturst. 17 124 (1959)
82. Chopra : Indigenous Drugs of India, Calcutta (1958) 500
83. Henri T.A. : The plant Alkaloids, Blackiston, Philadelphia (1949)4.
84. Willamen J.J., B.G. Schubert : Alkaloids bearing plants and their contained alkaloids, U.S. Dep. of Agriculture, Tech. Bull. 1234 (1961)
85. Zechner L. : Sci.pharm. 22, 254 (1954)
86. Korte F., J. Korte; Z. Naturf. 10 b, 223 (1955)
87. Tamm. Ch. : Fortschr.Chem.Org.Naturst. 14, 71 (1957)
88. Liebermann C. : Ber.Dsch.chem.Ges. 18, 1803 (1885)
89. Raymond W.D. : Analyst 63, 478 (1938); 64, 113 (1939)
90. Baljet M. : Z.Anal.Chem. 113, 378 (1938)
91. Huber H., F.Blindenbacher, K.Speiser, T.Reichstein : Helv.chim.Acta 34, 46 (1951)
92. Urscheler H.R., Ch. Tamm : Helv.chim.Acta 38, 865 (1955)
93. Keller M., T. Reichstein : Helv.Chim.Acta 32, 1607 (1949)

94. Hunger A., T. Reichstein : Helv.Chim.Acta 35, 429 (1952)
95. Watt J.M., M.G. Breyer-Brandwijk : The medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, E. and S. Livingstone Ltd^{2nd} (1962) 119.
96. Schmid W., H.P.Uehlinger, Ch.Tamm, T.Reichstein : Helv.chim.Acta 42 72 (1959)
97. Abisch E., Ch.Tamm, T.Reichstein : Helv.Chim.Acta 42, 1014 (1959)
98. Golar T., H.Jüger, T.Reichstein : Helv.Chim.Acta 43, 2035 (1960)
99. Krider M.M., H.A. Monroe jr., M.E. Wall, J.J.Willaman : J.Am.Ph. Ass.Sci. 46, 304 (1957)
100. Tschesche R., G.Snatzke, G.Grimmer : Naturwiss 46, 263 (1959)
101. Mauli R., Ch.Tamm, T.Reichstein : Helv.Chim.Acta 40, 305 (1957)
102. Mittal O.P., Ch.Tamm, T. Reichstein : Helv.chim.Acta. 45,907 (1962)
103. Hoch J.H. : A survey of Cardiac Glycosides and Genins, University of South Carolina Press (1961)
104. Frèrejacque M. : C.R. Acad.Sci 248, 3027 (1959)
105. Winkler R.E., T. Reichstein : Hel.chim.Acta. 37, 721 (1954)
106. Korte F. : Chem.Ber. 88, 10, 1527 (1955)
107. Korte F., H. Weitkamp : Chem. Ber. 89, 11, 2669 (1956)
108. Nascimento J.M., H. Jager, Ch.Tamm, T.Reichstein : Helv.chim. Acta. 42, 661 (1959)
109. Mitsuhashi H., Y.Shimizu : Chem.Pharm.Büll. (Japon) 7, 749, 949 (1959)
110. Baytop.T., M.Tanker : Bull. Fac. méd. Istanbul 22, 623 (1959) in Chem.Abstr. 54, 6036 f (1960)
111. Gager R.,L.Zechner : Arch. Pharm. 276, 43 (1938)
112. Zechner L. : Pharm. Monatschr. 19, 96 (1938)
113. Drechoff A. : Arch.Pharm. 272, 673 (1934)
114. Zolotnitskaya S.Ya. : Izvest. Akad. Nauk. Armyan. SSR, Biol.Sel'khoz, Nauki 7, n°5, 27 (1954); in Chem Abstr. 48, 11727d (1954)
115. Haznagy A., K. Szendrei, L. Toth : Pharmazie 20, 541 (1965)
116. Haznagy A., L. Toth, K. Szendrei : Pharmazie 20, 649 (1965)
117. Pailer M., W.Streicher : Monatshefte Chemie 96, 1094 (1965)
118. Kübler K. : Arch.Pharm. 246, 660 (1908)
119. Zechner L. : Ital. 440, 178, Oct.7 (1948) in Chem.Abstr. 45. 10516b (1951)
120. Zechner L., F. Wischo : Pharm. Monatschr. 79 (1928)
121. Zechner L. : Sci.pharm. 22, 229 (1954)
122. Pfeifer E. : Sci.pharm. 20, 229 (1952)
123. Zechner L., J. Kellermayr : Sci.pharm. 21, 153 (1953)
124. The Merck index (1960) 1094
125. Bally P.R.O., et coll. : Helv.chim.Acta. 34, 1740 (1951)

126. Huber H., F. Blindenbacher, K. Mohr, P. Speiser, T. Reichstein :
Helv. chim. Acta 34, 46 (1951)
127. Haberlandt G. : Sitzben. Akad. Wiss. Wien Math Naturwiss. 111, 69 (1902)
128. Gautheret R.J. : C.R. Acad. Sci. 206, 125 (1938)
129. White P.R. : Am. J. Bot. 26, 59 (1939)
130. Nobécourt P. : C.R. Soc. Biol. 130, 1270 (1939)
131. Heller R. : New Phytologist 55, 253 (1953)
132. Murashige T., F. Skoog : Physiol. Plantarum 15, 473 (1962)
133. White P.R. : The cultivation of animal and plant cells, The Ronald Press, New-York (1963) 228
134. Gautheret R.J. : Manuel techniques de culture des tissus végétaux, Masson, Paris (1942) 170
135. Gautheret R.J. : La culture des tissus végétaux, Masson, Paris (1959)
136. Ferguson J.D. : Ph. D. Thesis Univ. Wales (1958)
137. Street H.E. : Handbuch der Pflanzen physiologia, Vol. 11, Springer Verlag, Berlin (1959) 153
138. Carew D.P., E.J. Staba : Lloydia 28, 1 (1965)
139. Risser P.G., P.R. White : Physiol. Plantarum 17, 620 (1964)
140. Heller R. : Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Végét. 14, 1 (1953)
141. Nétien G., J. Lacharme : C.R. Soc. Biol. 159, 8, 1724 (1965)
142. Chan W.N., J. Staba : Lloydia 28, 55 (1965)
143. Scott K.J. et coll. : Plant Physiol. 30, 355 (1955)
144. Kordan H.A., L. Morganstern : Nature 195, 163 (1962)
145. Büchner St. A., A. Staba : J. Pharm. Pharmacol. 16, 733 (1964)
146. Staba E.J., S.S. Lamba : Lloydia 26, 29 (1963)
147. Nétien G. et coll. : Plant. médi. Phytothér. I, 42 (1967)
148. Dietrich P., E. Lederer : Chromatographie en chimie organique et biologique, Masson, Paris (1959)

---ooo00ooo---

